

Tesis Doctoral

Estudio de las bases moleculares de la resistencia a la terapéutica antiviral en la infección por el virus de hepatitis B.

Castillo, Amalia Inés

2018

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:

Castillo, Amalia Inés. (2018). Estudio de las bases moleculares de la resistencia a la terapéutica antiviral en la infección por el virus de hepatitis B.. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6481_Castillo

Cita tipo Chicago:

Castillo, Amalia Inés. "Estudio de las bases moleculares de la resistencia a la terapéutica antiviral en la infección por el virus de hepatitis B.". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6481_Castillo

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

Estudio de las bases moleculares de la resistencia a la terapéutica antiviral en la infección por el virus de hepatitis B.

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

Licenciada Amalia Inés Castillo

Directora de tesis: Dra. Verónica Mathet

Consejera de Estudio: Dra. Elsa Damonte

Lugar de trabajo: Laboratorio de Hepatitis Virales, Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPam- UBA-CONICET), Facultad de Medicina - UBA

Buenos Aires, 2018

Estudio de las bases moleculares de la resistencia a la terapéutica antiviral en la infección por el virus de hepatitis B

Resumen

La infección por el virus de la hepatitis B (HBV) constituye un importante problema de salud a nivel mundial, utilizándose análogos de nucleósidos (ANs) y/o inmunomoduladores para su tratamiento. Sin embargo, la terapia con estos fármacos a largo plazo puede tornarse ineficaz dada la frecuente aparición de mutantes resistentes. Actualmente se está estudiando la resistencia a fármacos no solo como un evento asociado a la aparición de mutaciones en el genoma viral, sino también a alteraciones en la expresión y actividad de bombas transmembrana en las células del hospedador.

Se ha reportado que la proteína X del HBV (HBx) es un potente transactivador de genes virales y celulares. Es por esto que se decidió evaluar *in vitro* la capacidad del HBV para afectar la expresión de algunas bombas transmembrana de la familia ABC (MRP4 y BCRP), involucradas en la detoxificación celular y cuya sobreexpresión está directamente asociada a una alteración en la sensibilidad a las drogas en las células infectadas, impidiendo que se alcance la concentración intracelular necesaria y suficiente para que sea eficaz. Llamativamente, se documentó un aumento en la actividad del promotor del gen *ABCC4* (MRP4) en células con sobreexpresión de HBx. A su vez, se observó un aumento en la expresión de la proteína MRP4 en un sistema de replicación *in vitro* del HBV, donde también está alterada la expresión de la proteína BCRP. Sin embargo, no se descarta que el virus pudiera afectar (a través de HBx u otras proteínas virales) más genes de esta familia constituyendo un mecanismo de resistencia a drogas antivirales poco estudiado hasta el momento.

Teniendo en cuenta el rol de las bombas ABC en la resistencia a antivirales, en el presente trabajo se evaluó la actividad antiviral de compuestos capaces de interactuar con membranas biológicas, como lo son los co-polímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) y de su combinación con un AN, así como su efecto sobre la expresión de genes ABC involucrados en la detoxificación celular. Uno de estos compuestos, el poloxámero F127, presentó capacidad antiviral intrínseca, sin afectar la expresión de los genes ABC estudiados, por lo cual consideramos que estos estudios constituyen un antecedente relevante para analizar su futura incorporación a la terapéutica anti-HBV actualmente en uso.

Palabras claves: HBV, HBx, transportadores ABC, MDR, antiviral

Study of the molecular basis of resistance to antiviral therapy in hepatitis B virus infection

Abstract

Infection with the hepatitis B virus (HBV) is a major health problem worldwide, using nucleoside analogues (ANs) and/or immunomodulators for its treatment. However, therapy with these drugs in the long term may become ineffective, given the frequent appearance of resistant mutants. Currently, drug resistance is being studied not only as an event associated to the appearance of mutations in the viral genome, but also to alterations in the expression and activity of transmembrane pumps in host cells.

It has been reported that X protein of HBV (HBx) is a potent transactivator of viral and cellular genes. Taking this factor into account, it was decided to evaluate *in vitro* the capacity of HBV to affect the expression of some transmembrane pumps of the ABC family (MRP4 and BCRP), involved in cellular detoxification and whose overexpression is directly associated with an alteration in the sensitivity to drugs in infected cells, preventing the necessary and sufficient intracellular concentration from being reached in order to be effective. Interestingly, an increase in the activity of the *ABCC4* gene promoter (MRP4) was documented in cells with HBx overexpression. In turn, an increase in the expression of the MRP4 protein was observed in an *in vitro* replication system of HBV, in which the expression of the BCRP protein is also altered. However, it is not ruled out that the virus could affect (through HBx or other viral proteins) more genes of this family constituting a mechanism of resistance to antiviral drugs little studied so far.

Considering the role of ABC pumps in antiviral resistance, in the present work we evaluated the antiviral activity of compounds capable of interacting with biological membranes, such as the co-polymers of poly(ethylene oxide) and poly(propylene oxide) and its combination with an AN, as well as its effect on the expression of ABC genes involved in cellular detoxification. One of these compounds, poloxamer F127, showed intrinsic antiviral capacity, without affecting the expression of the ABC genes studied, for which we consider that these studies constitute a relevant antecedent to analyze its future incorporation to the anti-HBV therapeutics currently in use.

Keywords: HBV, HBx, ABC transporters, MDR, antiviral

A mis papás, Martín y Elsa
A la memoria de mi tío Segundo
A Angie, Cris, Anto y Rita

**“Lo importante no es cuanto hacemos, sino cuanta honestidad,
cuanto amor y cuanta fe ponemos en lo que hacemos”**

Teresa de Calcuta

AGRADECIMIENTOS

En la elaboración de cualquier proyecto suelen surgir obstáculos, más aun cuando el trabajo necesario para llevarlo adelante es extenso y arduo, cuando por distintos motivos las condiciones para realizarlo no son las ideales. Y es ahí cuando el acompañamiento, las palabras de aliento, las palmadas en la espalda y la confianza de los que nos rodean se vuelven imprescindibles. Es por eso que hay muchas personas a quienes quiero agradecerles por haberme acompañado en este camino, haciendo posible la realización de este trabajo:

A mis padres, porque sé que aunque muchas veces no entendieron mis sueños y mis decisiones, siempre estuvieron ahí para apoyarme.

A mi tío Segundo, por haber confiado en mí más que nadie en este mundo. Y porque esa confianza me ayudó a creer en mí misma.

A Vero, por confiar en mí y abrirme las puertas del laboratorio, por haberme enseñado de qué se trata hacer investigación científica en la vida real; pero por sobre todas las cosas por haberme acompañado cada vez que la necesité, por la paciencia, por obligarme a enfrentar mis limitaciones pero sin dejarme sola en esa lucha. Por haber sido la mejor directora que pude haber tenido.

A José, por ser un ejemplo diario de perseverancia y amor por la ciencia. Por enseñarme que “siempre se puede hacer un poquito mejor”.

A cada uno de mis compañeros del lab en estos años, porque de todos ellos aprendí algo. En particular a quienes más compartieron conmigo momentos lindos y no tan lindos (y me soportaron más, en todo sentido): Emi, Andrés y Ceci. Por cada favor, por cada charla, por cada mate y por cada palabra de aliento. Nada hubiera sido lo mismo sin ustedes.

Al Dr. Davio y su equipo, sobre todo a Ale Carozzo, por estar siempre disponibles y con la mejor predisposición para brindarnos ayuda, para discutir ideas, experimentos, resultados... y para socorrernos ante la falta de cualquier reactivo!

A cada uno de mis amigos, especialmente a “los ingrátidos”: por apoyarme en todas las decisiones y entender mis ausencias. Por no dejarme bajar los brazos nunca. Por ser la familia que elegí y sigo eligiendo.

Particularmente, a tres personas que en el último tiempo me acompañaron bien de cerca (y casi haciéndome marca personal para que me pusiera a escribir): Juli, Marga y Adolfo. Gracias por creer en mí, por la paciencia, por consentirme de mil formas, por celebrar con alegría de mis logros y por compartir la tristeza de mis frustraciones.

A todos los que en algún momento me alentaron a seguir adelante, ¡gracias!

Los resultados de esta Tesis han originado las siguientes publicaciones:

PUBLICACIONES EN REVISTAS ESPECIALIZADAS

- Cuestas ML, **Castillo AI**, Sosnik A, Mathet VL (2012). Downregulation of *mdr1* and *abcg2* genes is a mechanism of inhibition of efflux pumps mediated by polymeric amphiphiles. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 6577–6579.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- XII Congreso Argentino de Virología. 26-28 de Septiembre de 2017, Ciudad de Buenos Aires, Argentina. Póster: “Evaluación in vitro de la actividad antiviral del poloxámero F127 combinado con un análogo de nucleósido sobre el Virus Hepatitis B: posibles implicancias en la terapéutica” **Amalia I. Castillo**, Emiliano A. Gentile, Andrés Bernardi, Matías Gómez, Cecilia Delfino, Albertina Moglioni, Graciela Moltrasio, José Oubiña, Verónica L. Mathet.
- XVIII Congreso Argentino de Hepatología. 4-6 de Junio de 2015, Ciudad de Buenos Aires, Argentina. Presentación oral: “Evaluación de la actividad antiviral de nuevos análogos nucleosídicos indánicos obtenidos por síntesis química frente al Virus Hepatitis B” María L. Cuestas, **Amalia I. Castillo**, Nair Eguibar, Priscila Perazzo, Cecilia Delfino, Emiliano A. Gentile, José R. Oubiña, Verónica L. Mathet.
- LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. 20 – 23 de Noviembre de 2013, Mar del Plata, Argentina. Póster: “Efecto de la proteína X del virus hepatitis B (HBV) sobre MDR1, MRP1 y BCRP: potenciales nuevas implicancias en la hepatitis B crónica, la oncogénesis viral y la terapéutica.” Cuestas M.; **Castillo A.**; Gentile E.; Delfino C.; Oubiña J.; Mathet V.
- XIII Congreso Argentino de Microbiología. 23- 26 de Septiembre de 2013, Buenos Aires, Argentina. Presentación oral: “Alteración en la expresión de transportadores ABC como consecuencia de la replicación del Virus de la Hepatitis B: ¿un mecanismo alternativo de resistencia al tratamiento con antivirales?” **Castillo, AI**; Cuestas, ML; Castronuovo, CC; Gentile, EA; Delfino, CM; Oubiña, JR; Mathet, VL.
- X Congreso Argentino de Virología. 26 – 29 de Septiembre de 2011, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Póster: “Estudio de la regulación de la expresión del transportador MRP4 por la proteína X del Virus Hepatitis B: implicancias en la resistencia a la terapéutica antiviral.” **Castillo, AI**; Cuestas, ML; Gentile, EA; Castronuovo, CC; Delfino, CM; Oubiña, JR y Mathet, VL.

El presente trabajo se realizó con la financiación proveniente de:

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- Universidad de Buenos Aires (UBA).
- Agencia Nacional para la Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	10
I. 1. EL VIRUS DE LA HEPATITIS B	11
a. Características virológicas	11
b. Genotipos del HBV	14
c. Patogenia	15
d. Mecanismos de persistencia viral	17
e. Proteína X del HBV (HBx)	20
f. Control de la enfermedad: prevención y tratamiento	23
i. Profilaxis	23
ii. Tratamiento antiviral	25
I. 2. SUPERFAMILIA DE TRANSPORTADORES ABC	30
a. Estructura y función de los transportadores ABC	30
b. Resistencia al tratamiento con antivirales y antitumorales asociada a los transportadores ABC	33
i. Proteína BCRP	33
ii. Proteína MRP4	37
iii. Proteína MRP5	45
iv. Proteína MDR1	46
v. Proteína MRP1	46
I. 3. CO-POLÍMEROS SEGMENTADOS DE PEO-PPO	47
a. Poloxaminas	48
b. Poloxámeros	48
c. Aplicaciones biomédicas y biofarmacéuticas de los co-polímeros de PEO-PPO	49
OBJETIVOS	53
PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS	55
• PACIENTES	56
• MATERIALES	56
MM. 1. LÍNEAS CELULARES	56
a. Cultivo y mantenimiento	56

b. Criopreservación	57
c. Control de contaminación con micoplasmas	57
MM. 2. COMPUESTOS	58
a. Co-polímeros segmentados de PEO-PPO	58
b. Análogos de nucleósidos	59
• METODOLOGÍA	60
MM. 3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL HBV SOBRE LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES ABC	60
a. Efecto de la replicación del HBV sobre la expresión de transportadores ABC	60
i. Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de transportadores ABC mediante PCR en tiempo real	60
1. Extracción de ARN a partir de cultivos celulares	60
2. Síntesis de ADNc	61
3. Medición del ARNm de genes ABC mediante PCR en tiempo real	61
ii. Cuantificación relativa de los niveles de proteína de transportadores ABC mediante <i>Western blot</i>	63
1. Obtención de extractos proteicos totales a partir de cultivos celulares y cuantificación de la concentración proteica	63
2. Fraccionamiento electroforético de las proteínas en SDS-PAGE	64
3. <i>Western blot</i>	64
iii. Cuantificación relativa del efecto de HBV sobre la actividad de los promotores de MRP4 y BCRP	65
b. Efecto de la proteína HBx sobre la expresión de transportadores ABC	66
i. Puesta a punto de la transfección en células hepatocitarias	67
ii. Amplificación de plásmidos mediante preparaciones de ADN (<i>miniprep</i> y <i>midiprep</i>) para transfección a pequeña y mediana escala	69
1. Obtención de bacterias electrocompetentes	69
2. Electroporación	70
3. <i>Miniprep</i>	70
4. <i>Midiprep</i>	71
5. Cuantificación del ADN plasmídico	72
iii. Transfección transitoria del gen X salvaje y mutado del HBV en células hepatocitarias	72
1. Transfección de células HuH7	72
2. Transfección de células HepG2/C3A	72

iv. Detección de la expresión de las proteínas X salvaje y mutada del HBV mediante <i>Western blot</i>	73
1. Obtención de extractos proteicos totales a partir de cultivos celulares	73
2. Fraccionamiento electroforético de las proteínas en SDS-PAGE	73
3. <i>Western blot</i>	73
v. Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de transportadores ABC mediante PCR en tiempo real	74
1. Extracción de ARN a partir de cultivos celulares	74
2. Síntesis de ADNc	74
3. Medición del ARNm de genes ABC mediante PCR en tiempo real	74
vi. Cuantificación relativa de los niveles de proteína de transportadores ABC mediante <i>Western blot</i>	74
vii. Cuantificación relativa del efecto de la proteína HBx sobre los promotores de MRP4 y BCRP	74
c. Efecto del HBV sobre la vía de señalización de las MAPK y su regulador negativo MKP-1	75
i. Estudio del efecto de la expresión de la proteína X sobre la fosforilación de ERK1/2	75
1. Obtención de extractos proteicos totales a partir de cultivos celulares	75
2. Fraccionamiento electroforético de las proteínas en SDS-PAGE	75
3. <i>Western blot</i>	76
4. Remoción de los complejos anticuerpo primario-anticuerpo secundario para la detección posterior de otro antígeno (proteína no fosforilada)	76
ii. Estudio del efecto de la replicación del HBV y de la expresión de la proteína X sobre la expresión del ARNm de MKP-1	77
1. Extracción de ARN a partir de cultivos celulares	77
2. Síntesis de ADNc	77
3. Medición de variaciones relativas del ARNm de MKP-1 mediante PCR semicuantitativa	77
MM. 4. DESARROLLO DE ESTRATEGIAS TECNOLÓGICAS TENDIENTES A OPTIMIZAR LA TERAPÉUTICA CONTRA EL HBV	79
a. Estudio del efecto de diferentes análogos de nucleósidos desarrollados en nuestro país en el contexto de un sistema <i>in vitro</i> de replicación del HBV	79
i. Evaluación de citotoxicidad (método de MTS/PMS)	79

ii. Estudio del efecto de los análogos de nucleósidos sobre la replicación del HBV _____	80
b. Estudio de la acción de co-polímeros lineales y ramificados de PEO-PPO sobre la expresión de transportadores ABC _____	81
i. Evaluación de citotoxicidad _____	81
ii. Estudio del efecto de los poloxámeros y poloxaminas estudiados sobre los niveles de ARNm de los transportadores ABC _____	81
c. Diseño de formulaciones droga-co-polímero y estudio de su efecto <i>in vitro</i> _____	82
i. Sobre la replicación del HBV _____	83
ii. Sobre la expresión del ARNm de los transportadores ABC _____	83
MM. 5. ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESISTENCIA A DROGAS ANTIVIRALES EN PACIENTES CRÓNICAMENTE INFECTADOS CON HBV _____	83
a. Estudio de mutaciones en el dominio de Transcriptasa Inversa (TI) del gen <i>pol</i> del HBV asociadas a la resistencia a drogas antivirales _____	84
i. Extracción de ADN sérico _____	84
ii. Reacción de PCR para el gen <i>pol</i> del HBV _____	84
iii. Genotipificación del HBV mediante secuenciación nucleotídica y análisis filogenético de las secuencias obtenidas del producto de PCR _____	86
b. Estudio de polimorfismos en el gen <i>ABCC4/MRP4</i> asociados a trastornos en la actividad funcional de dicha bomba _____	87
i. Extracción de ADN a partir de muestras de sangre _____	87
ii. Reacciones de PCR para la detección de polimorfismos en el gen <i>ABCC4/MRP4</i> _____	88
iii. Análisis de las secuencias obtenidas del producto de PCR para la detección de polimorfismos en el gen <i>ABCC4/MRP4</i> _____	89
MM. 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS _____	91

RESULTADOS _____ 92

CAPÍTULO 1. Estudio del efecto del HBV sobre la expresión de transportadores ABC _____ 93

R1. 1. Efecto de la replicación del HBV sobre la expresión de transportadores ABC _____	93
a. Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de transportadores ABC mediante PCR en tiempo real _____	93

b. Cuantificación relativa de los niveles de proteína de transportadores ABC mediante <i>Western blot</i>	96
c. Cuantificación relativa del efecto del HBV sobre la actividad de los promotores de MRP4 y BCRP	97
R1. 2. Efecto de la proteína HBx sobre la expresión de transportadores ABC	98
a. Transfección de células hepatocitarias	98
b. Detección de la expresión de las proteínas X salvaje y mutada del HBV mediante <i>Western blot</i>	99
c. Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de transportadores ABC mediante PCR en tiempo real	101
d. Cuantificación relativa de los niveles de proteína de transportadores ABC mediante <i>Western blot</i>	103
e. Cuantificación relativa del efecto de la proteína HBx sobre los promotores de MRP4 y BCRP	104
R1. 3. Efecto del HBV sobre la vía de señalización de las MAPK y su regulador negativo MKP-1	106
a. Estudio del efecto de la expresión de la proteína X sobre la fosforilación de ERK1/2	106
b. Estudio del efecto de la replicación del HBV y de la expresión de la proteína X sobre la expresión del ARNm de MKP-1	108
CAPÍTULO 2. Desarrollo de estrategias tecnológicas tendientes a optimizar la terapéutica contra el HBV	111
R2. 1. Estudio del efecto de diferentes análogos de nucleósidos desarrollados en nuestro país en el contexto de un sistema <i>in vitro</i> de replicación del HBV	111
R2. 2. Estudio de la acción de co-polímeros lineales y ramificados de PEO-PPO sobre la expresión de transportadores ABC	112
R2. 3. Diseño de formulaciones droga-co-polímero y estudio de su efecto <i>in vitro</i> sobre la replicación del HBV	115
R2. 4. Estudio del efecto <i>in vitro</i> de las formulaciones droga-copolímero sobre la expresión del ARNm de los transportadores ABC	117

CAPÍTULO 3.	Análisis del perfil de resistencia a drogas antivirales en pacientes crónicamente infectados con HBV	119
R3. 1.	Estudio de mutaciones en el dominio de Transcriptasa Inversa (TI) del gen <i>pol</i> del HBV asociadas a la resistencia a drogas antivirales	119
R3. 2.	Estudio de polimorfismos en el gen <i>ABCC4/MRP4</i> asociados a trastornos en la actividad funcional de dicha bomba	123
R3. 3.	APÉNDICE	126
DISCUSIÓN		127
CONCLUSIONES		144
BIBLIOGRAFÍA		146

ABREVIATURAS

- * ABC: cassette de union a ATP/ *ATP- binding cassette*
- * ADN: ácido desoxirribonucleico
- * ADNc: ADN copia
- * ADNccc: ADN circular covalentemente cerrado
- * ADP: adenosin difosfato
- * ADV: adefovir
- * AhR: *aryl hydrocarbon receptor*
- * AMP: adenosin monofosfato
- * AMPc: adenosin monofosfato cíclico
- * ANs: análogos de nucleós(t)idos
- * AP-1, AP-2: *activator protein-1, -2*
- * AR: receptor de andrógenos
- * ARN: ácido ribonucleico
- * ARNm: ARN mensajero
- * ARNpg: ARN pre-genómico
- * ATF/CREB: factor activador de la transcripción/proteínas de unión a los elementos de respuesta de AMPc (*activating transcription factor/cAMP response element binding proteins*)
- * ATP: adenosin trifosfato
- * AZT: zidovudina
- * BCP: promotor basal del core / *basal core promoter*
- * BCRP: *breast cancer resistance protein*
- * BHE: barrera hemato-encefálica
- * C/EBP: proteínas de unión al potenciador transcripcional CCAAT (*CCAAT/enhancer binding proteins*)
- * CAR: *constitutive androstane receptor*
- * CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*
- * CDs: células dendríticas
- * CMC: concentración micelar crítica
- * CMH: complejo mayor de histocompatibilidad
- * CPA: células presentadoras de antígeno
- * DMEM: Medio Eagle modificado Dulbecco/ *Dulbecco's modified Eagle's medium*
- * DMSO: dimetilsulfóxido
- * dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato
- * eGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*
- * ER: receptor de estrógenos

- * ERCC2, ERCC3: endonucleasa del grupo 2/3 que escinde oligómeros de 24-32 nucleótidos que incluyen el ADN dañado (*excision repair cross complementing -group 2/3*)
- * ERG: elemento de respuesta a glucocorticoides
- * ETV: entecavir
- * FXR: *farnesoid xenobiotic receptor*
- * GMP: guanosin monofosfato
- * GRAS: Generalmente reconocido como seguro / *Genarally recognized as safe*
- * GST: glutatión
- * h: hora
- * HBcAg: antígeno “core” del HBV
- * HBeAg: antígeno “e” del HBV
- * HBIG: inmunoglobulina específica o hiperinmune para el HBV
- * HBsAg: antígeno de superficie del HBV
- * HBV: Virus de la Hepatitis B
- * HCC: carcinoma hepatocelular
- * HCV: Virus de la Hepatitis C
- * HDV: Virus de la Hepatitis D
- * HIV: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- * HLB: balance hidrofílico-lipofílico
- * HNF1: factor hepatocitario nuclear 1
- * IFN: interferón
- * IL: interleuquina
- * kDa: kiloDalton
- * LAM: lamivudina
- * LB: linfocitos B
- * LB: Luria Bertoni
- * LT: linfocitos T
- * MAP: Proteína activada por mitógenos/ *Mitogen-Activated Protein*
- * MDR: resistencia a múltiples drogas/ *multidrug resistance*
- * min: minutos
- * miRNA: micro ARN
- * MKP: MAP quinasa- fosfatasa
- * M-MLV: Transcriptasa inversa del virus de leucemia murina de Moloney
- * MRP: *multidrug resistance protein*
- * MSD: dominio transmembrana/ *membrane spanning domain*
- * NBD: dominio de union a nucleótido/ *nucleotide binding domain*
- * NF-κB: factor nuclear -κB
- * Nrf2: *NFE2-related factor 2*
- * Oct-1: *organic cation transporter-1*

- * OMS: Organización Mundial de la Salud
- * ORF: marco abierto de lectura/ *open reading frame*
- * pb: pares de bases
- * PBS: buffer salino de fosfato
- * PBS-T: PBS-Tween
- * PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- * PEG: polietilenglicol
- * Peg-IFN: interferón pegilado
- * PEO: poli(óxido de etileno)
- * P-gp: glicoproteína-P
- * Pol: polimerasa
- * PPAR: *peroxisome proliferator-activated receptor*
- * PPIasa: peptidil prolil isomerasa
- * PPO: poli(óxido de propileno)
- * PVDF: fluoruro de polivinilideno
- * qPCR: PCR cuantitativa
- * RIA: radio inmunoensayo
- * RXR: *retinoid X receptor*
- * SDS: dodecil sulfato de sodio
- * SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
- * SFB: suero fetal bovino
- * SNP: polimorfismo de base única/ *single nucleotide polymorphism*
- * TAF: tenofovir alafenamide
- * TBP: *TATA binding protein*
- * TBV: telbivudina
- * TDF: tenofovir disoproxil fumarato
- * TI: transcriptasa inversa
- * TMD: dominio transmembrana/ *transmembrane domain*
- * TNF: Factor de Necrosis Tumoral/ *Tumor Necrosis Factor*
- * UI: unidades internacionales
- * UTR: *untranslated region*
- * V: Volts
- * WB: *Western blot*

INTRODUCCIÓN



*“El conocimiento no es una
vasija que se llena, sino un
fuego que se enciende”.*

Plutarco

I. 1. EL VIRUS DE LA HEPATITIS B

La hepatitis B es una enfermedad de distribución mundial, potencialmente mortal causada por el HBV. Su único reservorio en la naturaleza es el hombre enfermo o portador, aunque recientemente se ha reportado que los macacos (*Macaca fascicularis*) también pueden ser portadores crónicos y transmitirlo. La hepatitis B crónica constituye un importante problema de salud a nivel mundial y es el tipo más grave de hepatitis viral. El HBV no sólo está asociado a enfermedad crónica del hígado, sino también a cirrosis y carcinoma hepatocelular (HCC) [Lin y Kao, 2018]. Cabe destacar, que entre el 15 y el 25% de los infectados crónicos fallecen prematuramente debido a dichas enfermedades. Según la Organización Mundial de la Salud [OMS, 2017], se estima que hay 257 millones de personas con infección crónica por el virus de la hepatitis B (definidas como positivas al antígeno superficial del virus de la hepatitis B) y en 2015, la hepatitis B ocasionó 887.000 muertes, la gran mayoría debido a sus complicaciones, incluida la cirrosis y HCC.

El material más infectante es la sangre del enfermo o portador del HBV, donde se han detectado hasta 10^{14} partículas/ml (al menos 10^7 son partículas infectivas o partículas de Dane), y una concentración menor en el semen y otros fluidos o secreciones. Son necesarias 100 partículas para infectar a primates susceptibles no inmunes.

a. Características virológicas

Los estudios de microscopia electrónica de preparaciones parcialmente purificadas del HBV provenientes de suero humano demostraron tres tipos de partículas (figura 11): 1) partículas de 42 nm doblemente cubiertas, denominadas de Dane (en homenaje a su descubridor) y que constituyen el virión intacto; 2) esferas de 22 nm, habitualmente presentes 10^3 - 10^6 veces en exceso con relación al número de viriones; y 3) filamentos de 22 nm de diámetro y de longitud variable (hasta 250-300nm). Estas dos últimas formas subvirales del HBV son partículas envueltas vacías, por lo que al carecer de ácido nucleico no son infectivas.

Sin embargo, cabe destacar que estas formas subvirales del HBV son muy inmunogénicas e inducen eficientemente la secreción de los anticuerpos neutralizantes anti-HBs. Formas puras de estas partículas no infectivas provenientes del plasma de pacientes crónicamente infectados por HBV constituyeron la base de la primera vacuna obtenida en el mundo contra este virus.

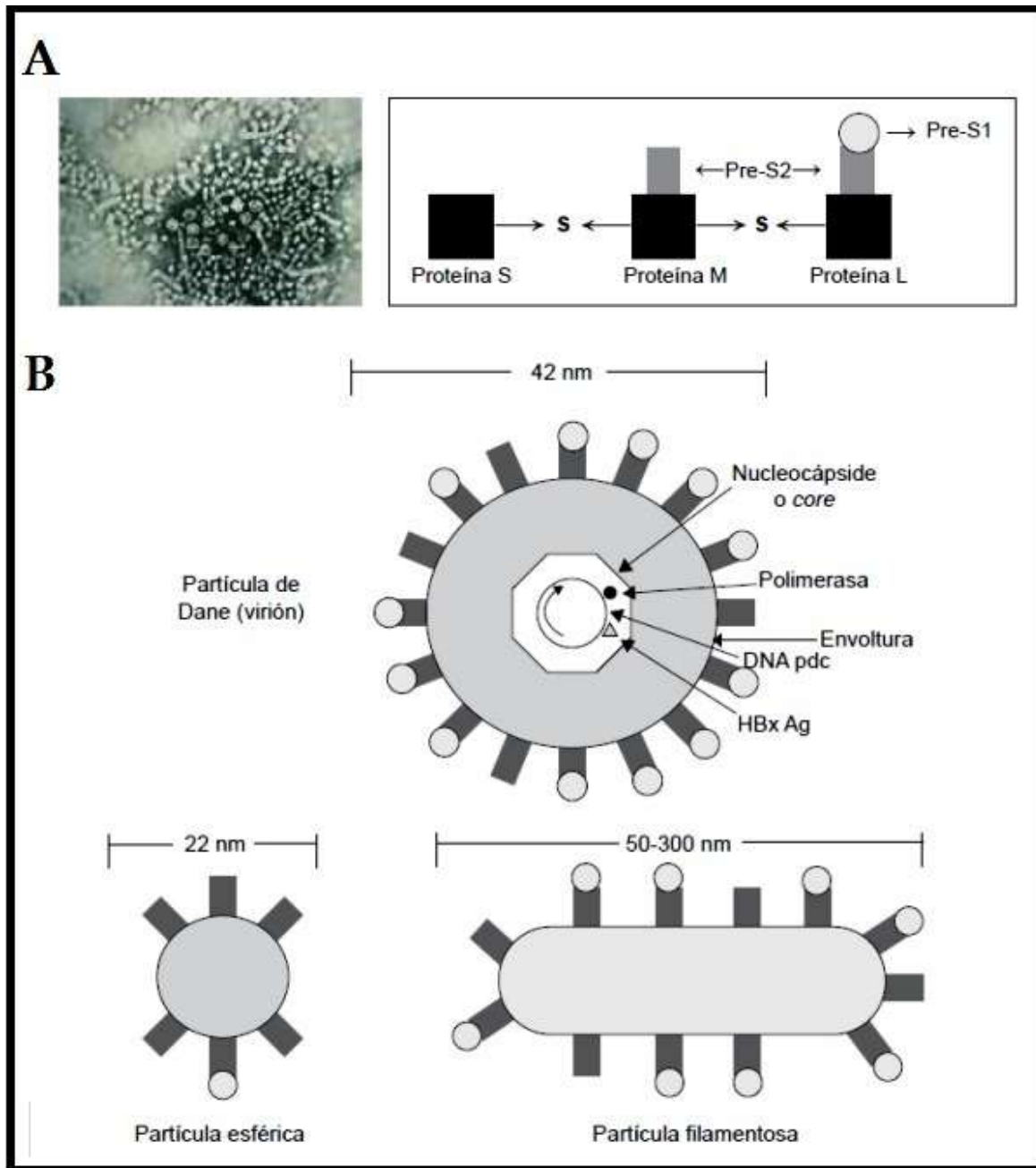


Figura 11. A. Virus hepatitis B. La microfotografía electrónica muestra tres tipos de estructuras: partículas subvirales esféricas y filamentosas, y partículas (infectivas) de Dane (De Ford E. y Gerin J. 100.000 X). **B.** Diagrama de las estructuras exhibidas en el panel A (no mostradas en escala). pdc: parcialmente doble cadena. [Fuente: “Virología Médica” Carballal G y Oubiña JR. Editorial Corpus. 4ta. Edición].

La envoltura del HBV es una estructura macromolecular compleja constituida por tres glicoproteínas virales relacionadas: pre-S1 o L HBs Ag (L: *large*- grande), pre-S2 o M HBs Ag (M: *middle*- mediana) y S o S HBs Ag (S: *small*- pequeña). La proteína S, también conocida como antígeno de superficie del HBV (HBsAg) es el principal componente de la envoltura viral.

La remoción artificial de la envoltura de la partícula de Dane con detergentes no iónicos libera una nucleocápside o core de 27 nm, cuyo principal componente es una fosfoproteína de 22 kDa que constituye el antígeno del core o HBcAg.

Asociada a la nucleocápside se encuentra una proteína de 16-19 kDa a la que inicialmente se le atribuyó actividad de proteína-quinasa (la proteína X) y la ADN polimerasa viral. Un producto del clivaje del polipéptido pre-core se conoce como proteína “e” o HBeAg. Esta proteína no está asociada a la partícula viral, sino que existe libre en circulación en forma soluble, luego de ser secretada desde los hepatocitos. En el interior de la nucleocápside está localizado el genoma viral, el cual consiste en una molécula de ADN circular, laxa y parcialmente bicatenaria de aproximadamente 3.200 nucleótidos.

Los procesos transcripcionales del genoma del HBV están regulados por: (i) 2 potenciadores o *enhancers* (enhI y enhII), (ii) 4 promotores (el del core, el de pre-S2/S, el de pre-S1 y el de X), (iii) 1 elemento silenciador (*silencer element*), (iv) 1 elemento de respuesta a glucocorticoides (ERG), y (v) 1 elemento CCAAT (caja de inicio de la transcripción).

En el genoma del HBV existen cuatro marcos abiertos de lectura (MAL = ORF: del inglés *Open Reading Frame*) principales y superpuestos entre sí: 1) el de la nucleocápside o core, que codifica las proteínas pre-core y core; 2) el de la envoltura, que codifica las proteínas de envoltura pre-S1, pre-S2 y S; 3) el de X, que codifica la proteína X (o HBxAg); y 4) el de Pol (también designado P), que codifica la polimerasa viral.

El marco abierto de lectura de la nucleocápside y el de la envoltura poseen más de un codón de iniciación de la traducción ubicados en fase, de ahí que cada ORF codifique para más de un polipéptido parcialmente idéntico en secuencia, pero de diferente longitud. El marco abierto de X codifica un único polipéptido, la proteína X. El ORF que codifica para la polimerasa viral se solapa con los otros tres ORF anteriormente mencionados, pero no en fase, por lo cual se generan proteínas diferentes. Lo anterior adquiere relevancia cuando ocurren mutaciones en la secuencia que codifica para el HBsAg (por ej., como consecuencia de la presión de selección inducida en el hospedador por la inmunoprofilaxis específica), ya que dichos cambios nucleotídicos se producirán también en la secuencia de la polimerasa viral, traducándose o no en un cambio aminoacídico. De la misma manera, cambios nucleotídicos en el ORF de la polimerasa viral (por ejemplo, como consecuencia de la presión de selección ejercida por acción de la terapia con antivirales) pueden tener implicancias más o menos importantes en las proteínas de la envoltura.

b. Genotipos del HBV

Todas las cepas del HBV examinadas hasta el presente corresponden a un único serotipo. Ello explica la protección cruzada conferida por una infección pasada con HBV frente a eventuales reinfecciones con cepas diferentes.

El HBV puede ser clasificado en 10 genotipos, comprendidos entre las letras A y J del alfabeto [Rajoriya *et al.*, 2017]. Cada genotipo incluye cepas que exhiben entre sí una divergencia intergenotípica mayor al 8% en la secuencia nucleotídica del genoma completo, y/o una divergencia intergenotípica mayor al 4% en la secuencia nucleotídica del gen S. Estos genotipos presentan distinta distribución geográfica: al genotipo A se lo encuentra principalmente en el norte de Europa, América del Norte y centro de África; al B y al C en el sudeste continental asiático y Japón. El genotipo D, tiene una distribución universal, aunque predomina en India y en la región del Mediterráneo; mientras que el genotipo E se encuentra principalmente en el oeste de África. El genotipo F –el de mayor divergencia nucleotídica– prevalece en América Central y del Sur; el G en Alemania, EE.UU., Francia y México; el H en América Central, el J en Japón y el I en Laos y Vietnam.

En Argentina, entre los pacientes con hepatitis B crónica, prevalece el genotipo F (más del 60%) [Pisano *et al.*, 2016; Delfino *et al.*, 2015], seguido de los genotipos A, D, C y B; aunque entre los pacientes coinfectados con HBV y HIV predomina el genotipo A (alrededor del 80%), seguido del D y el F. El genotipo G se distingue del resto de los genotipos por poseer dos codones de terminación en la región del pre-core, lo cual impide la traducción del polipéptido homónimo, precursor del HBeAg. Ello significa que los individuos mono infectados con este genotipo no van a presentar HBeAg detectable en suero.

Se han identificado para los genotipos A, B, C, D y F múltiples subgenotipos (subgrupos dentro un mismo genotipo de HBV con una divergencia intergrupar del 4% al 8%) en la secuencia nucleotídica del genoma completo.

Recientemente se han detectado recombinantes intergenotípicas, como por ejemplo: A/B/C, A/C, A/E, A/G, C/D, C/F y C/G. Los genotipos A y C son los que presentan la mayor tendencia a producir eventos de recombinación. Los eventos de recombinación intergenotípica pueden ocurrir cuando dos o más genomas virales de diferentes genotipos infectan una misma célula.

En los últimos años, se han ido acumulando cada vez más evidencias que asocian la evolución del curso natural de la infección, el cuadro clínico inicial y la respuesta al tratamiento antiviral, con el/los genotipo(s) del HBV involucrados. Por ejemplo, al genotipo F del HBV se lo asocia con una mayor tasa de mortalidad. También se observó que el genotipo F prevalece entre los pacientes con HCC comparado con aquellos sin HCC (68% *versus* 18%, respectivamente) y que en pacientes infectados con dicho genotipo, el tiempo

promedio requerido para el desarrollo del HCC es menor que para los otros (22,5 vs 60 años al cabo del diagnóstico inicial de infección por HBV, respectivamente).

Con respecto a la respuesta al tratamiento antiviral, se observó que los pacientes infectados con genotipo A o B responden mejor a la terapia antiviral con interferón- α (IFN- α) que los infectados con los genotipos C o D, y que los pacientes infectados con el subgenotipo A2 no responderían a la terapia con adefovir (ADV) debido a un polimorfismo presente en la polimerasa del HBV perteneciente a dicho subgenotipo que lo hace naturalmente resistente al ADV (rtL217R).

Cabe destacar que además del genotipo viral, el curso de la infección con HBV también depende de factores del hospedador como el sistema inmune, la edad, el sexo, la coinfección con HCV y/o HIV, la coinfección o sobreinfección con HDV, la obesidad y el alcohol, entre otros. Se ha postulado que la genotipificación del HBV debería implementarse antes de iniciar la terapéutica antiviral.

c. Patogenia

Es ampliamente aceptado que la respuesta inmune celular dirigida contra antígenos virales expresados en la superficie del hepatocito es responsable tanto de la injuria hepatocítica como de la eliminación viral de esa célula. Sin embargo, en individuos inmunosuprimidos se ha observado también la posible participación de ciertos mecanismos directos de injuria.

Estudios pioneros documentaron que la eliminación de la infección aguda del HBV en el hígado ocurre fundamentalmente mediante mecanismos no citolíticos mediados por IFN- γ y TNF- α secretadas por células CD8+, a los que sucede una fase complementaria mediada por la actividad citotóxica de dichas células [Faure-Dupuy *et al.*, 2017]. Dichas células citotóxicas activadas median a través del IFN- γ la inducción de diversas quimioquinas que atraen localmente a células proinflamatorias inespecíficas que amplifican el daño hístico.

De acuerdo con el modelo propuesto, bajo la modulación de linfocitos T (LT) colaboradores CD4+ Th1, los LT citotóxicos CD8+ responden a uno o más antígenos expresados en la membrana del hepatocito ejerciendo funciones efectoras, que producen la injuria celular y la eliminación de la célula infectada del tejido hepático [Ferrari, 2015]. A su vez, bajo la influencia de LT colaboradores CD4+ Th2 (actualmente denominados T foliculares *helper* o Tfh), los linfocitos B (LB) sintetizan anticuerpos necesarios para la eliminación del HBV circulante.

Todas las funciones mencionadas podrían ser a su vez reguladas por LT supresores (T regulatorias -Tregs- con fenotipo CD4+ o CD8+). La población de Tregs naturales con expresión constitutiva de las moléculas CD4, CD25 y FoxP3 suprime mediante el contacto célula-célula una variedad de células inmunes y de respuestas incluyendo la de células CD4+CD25-, la producción de IL-2 y la

proliferación de células CD8+, la producción de IFN- γ y la actividad citotóxica. Si bien estas células *Tregs* requieren la activación con antígenos específicos para adquirir el fenotipo supresor, una vez activadas ejercen los efectos inhibitorios tanto en una manera antígeno-específica, como antígeno-inespecífica.

Los LT CD8+ supresores pueden también inhibir la proliferación T y la citotoxicidad tanto mediante contacto célula-célula, como a través de la secreción de IL-10. Esta citoquina puede inhibir la expresión de moléculas del CMH-I, y contribuir por ende a la inhibición de la citotoxicidad mediada por células CD8+. Se acepta que una respuesta vigorosa, policlonal y multiespecífica de los LT CD8+ (dirigida contra epítopes de las proteínas S, C, Pol o X) promueve la limitación de la infección durante la fase aguda de la infección. Por el contrario, una respuesta débil, oligoclonal y oligo-monoespecífica de LT CD8+, se asocia a la infección persistente.

Existen evidencias que sugieren que también podrían participar otros mecanismos patogénicos en la infección del hepatocito, como por ejemplo, la sobreproducción de la proteína pre-S1 que inhibe la liberación a la circulación de la proteína S. Como consecuencia, las células adoptan un aspecto histológico de vidrio esmerilado en las que se observa al microscopio electrónico una acumulación de partículas filamentosas en su retículo endoplásmico. Subsiguientemente, ocurre la muerte celular en presencia de una respuesta inflamatoria, asociada con elevación de las transaminasas. La gravedad de la lesión es proporcional al grado de acumulación de los filamentos en el retículo endoplásmico de los hepatocitos. Como se ha mencionado anteriormente la inhibición de la secreción de la proteína S debida a un exceso del pre-S1 ocurre en pacientes crónicamente infectados con cepas de HBV que presentan mutaciones o deleciones en las regiones promotoras de pre-S1 y pre-S2/S. De ahí que algunos autores postulen que en la infección crónica el daño hepático es producido, al menos parcialmente, por la propia infección viral y no únicamente por la respuesta inmune.

Finalmente, se ha observado que la coinfección del HBV con HDV es capaz también de producir injuria celular.

Por último, los microRNAs también juegan un papel importante en la patogénesis de la infección por HBV [Wong *et al.*, 2018]. Los microRNAs (miRNAs o miRs) son moléculas de ARN pequeño (19-23 nucleótidos) no codificantes que participan en la regulación de casi todos los procesos celulares de todos los eucariotas multicelulares. Uno de los miRNAs más estudiados en la infección con HBV y otras enfermedades hepáticas asociadas como el HCC es el miR-122 [Qiu *et al.*, 2017]. Este miRNA específico de la glándula hepática se expresa en altos niveles en los hepatocitos normales y cumple un papel esencial en varios aspectos fisiológicos del funcionamiento hepático como el metabolismo lipídico, el desarrollo hepático, los procesos de diferenciación, crecimiento y transformación neoplásica. Se ha observado que la inhibición de la expresión de miR-122 impide la replicación del HCV pero potencia la del HBV. Sin embargo

miR-122 puede regular negativamente la expresión de genes virales y su replicación al interactuar directamente con secuencias altamente conservadas del genoma del HBV. La proteína X del HBV podría estar implicada en la desregulación de miR-122 y por ende en la desregulación de la proliferación celular, la inmortalización y la hepatocarcinogénesis [Wang *et al.*, 2017].

d. Mecanismos de persistencia viral

El mecanismo de persistencia viral no se ha dilucidado totalmente, pero se reconocen múltiples factores –virales y celulares– que permiten la permanencia del virus en el hospedador con o sin replicación viral [Mani y Andrisani, 2018]. Entre los mismos se pueden mencionar: a) características generales del hospedador; b) supresión específica del sistema inmune; c) generación de variantes/ mutantes del HBV que permitan la evasión a la respuesta inmune; d) persistencia de formas genómicas estables del HBV dentro de la célula (ADNccc); e) infección de sitios privilegiados (linfocitos, etc.); y f) integración del genoma viral al genoma celular.

a) Características generales del hospedador. Diversos factores propios del hospedador parecerían influir en la instalación y/o mantenimiento de la persistencia viral como son:

La edad del paciente en el momento de la infección: el 90-95% de los recién nacidos infectados desarrollan una infección crónica, mientras que sólo un 1-10% de los adultos evolucionan a la cronicidad. El HBeAg, polipéptido que comparte epítopes T CD4+ y CD8+ con el HBcAg, atraviesa la placenta induciendo tolerancia inmunológica en el recién nacido; mientras que en los adultos el HBeAg produce un cambio de la respuesta Th1 a Th2.

El sexo: se observó que las mujeres son menos afectadas que los hombres, ya que la cirrosis como consecuencia de una infección crónica por HBV ocurre en una relación 2:1 entre hombres y mujeres, mientras que el HCC tiene una incidencia 5 a 7 veces superior en los hombres. Recientemente se ha determinado que la proteína X está implicada en el aumento de la transcripción de los genes regulados por andrógenos de manera directamente proporcional a los niveles de esta hormona [Zhu *et al.*, 2011; Gu *et al.*, 2013].

b) Supresión específica del sistema inmune. En los pacientes infectados crónicamente con HBV la respuesta de los LT CD4+ y CD8+ específicos está significativamente disminuida. Esta disminución es más acentuada en la población de LT CD8+ específicos contra diversos epítopes del *core*, donde no sólo esta estirpe celular se torna indetectable, sino que inclusive se ve disminuida su habilidad para producir IFN- γ . En estos pacientes también se ha observado una baja respuesta de los LT CD4+, probablemente debida a una disminución en la función de las células dendríticas (CDs) infectadas con HBV, las cuales presentan una disminución en la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-12.

c) Significación clínica de la variación genómica del HBV [Tong *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016]

Variaciones en la región pre-core/core: se ha asociado estrechamente la infectividad del HBV a la detección del HBeAg en suero. Sin embargo, diversos estudios demostraron que en aproximadamente un 70% de los pacientes con hepatitis B crónica con serología negativa para HBeAg, se detecta ADN viral en circulación y niveles séricos fluctuantes de las aminotransferasas hepáticas. A estas variantes virales se las denomina HBe *minus* (HBe-). La mutación más común es la sustitución del nucleótido G por el A en la posición 1896 de la región genómica de pre-core (codón 28), que se traduce en el cambio del triplete codificador de triptófano (TGG) por un codón de terminación (TAG), promoviendo así la terminación traduccional prematura de esta proteína. De esta manera, al verse interrumpida la síntesis completa de la proteína pre-core de la cual deriva el HBeAg se inhibe la síntesis de este último. Por el contrario, la síntesis de la proteína del core no se ve afectada y por ende las partículas de Dane pueden formarse [Kim *et al.*, 2016].

Otra mutación que se observa con frecuencia es la sustitución nucleotídica G por A en la posición 1899 del ORF que codifica el pre-core. Este cambio, resulta también en un codón de terminación prematura de la traducción, que va a ser responsable de la síntesis de una proteína pre-core truncada. Como consecuencia de ello, también va a estar inhibida la síntesis del HBeAg. Es común encontrar que esta mutación puntual acompañe a la sustitución nucleotídica G1896A.

Las mutaciones más usuales a nivel del BCP (*Basal Core Promoter* o Promotor Basal del Core) son la sustitución del nucleótido A por el T en la posición 1762; y la del nucleótido G por el A en la posición 1764 de la región genómica del core. Estas mutaciones, que pueden aparecer solas o combinadas entre sí, se traducen en una disminución de la expresión del HBeAg. Dichas variantes están asociadas a un 10% de los casos de hepatitis B fulminantes, y a un 27% de casos de hepatitis B crónica progresiva.

La observación de que el curso de la infección por HBV sin antigenemia HBe puede variar entre subclínica y fatal sugiere que, además de la mencionada, otras mutaciones podrían intervenir en el desenlace de aquélla.

Variaciones en la región X: dado que el marco abierto de lectura de pre-core/core se solapa con el de X, los cambios nucleotídicos A1762T y G1764A que ocurren en la secuencia del BCP en el ORF de pre-core/core son responsables de los cambios nucleotídicos en X que se traducen a su vez, en los cambios aminoacídicos K130M y V131I, respectivamente. Estos cambios incrementan la unión del factor hepatocitario nuclear 1 (HNF1) al ADN produciendo un potente efecto transactivador. Diversos estudios demostraron, que los pacientes con hepatitis B crónica infectados con dichas mutantes de HBx, presentan un mayor riesgo de desarrollar HCC [Kim *et al.*, 2016].

Variaciones en la región pre-S/S: algunas de las variantes fenotípicas observadas en la envoltura viral pueden tener relevancia por tres motivos: a)

escape a la respuesta inmune del hospedador; b) escape a la detección diagnóstica; y c) escape dual a ambos eventos.

Si bien las vacunas contra la hepatitis B que contienen como inmunógeno al HBsAg inducen protección completa contra la infección por el virus salvaje, diferentes estudios demostraron la posibilidad de adquirir la infección por dicho virus aun en aquellos casos en los cuales se había administrado una adecuada inmunización activa/pasiva. Todas las vacunas anti-HBV actualmente comercializadas están compuestas por HBsAg salvaje; es decir que en ellas no están incluidos los antígenos de superficie mutantes descritos hasta el momento en el mundo. Algunas de estas variantes que contienen HBsAg mutado, además pueden escapar a la detección inmunológica por parte de algunos de los equipos comerciales usados para el diagnóstico de la infección por HBV y en los tamizajes de los bancos de sangre. Diversos autores documentaron la selección de mutantes de escape del HBV (como G145R) durante la aplicación de inmunoprofilaxis pasiva específica a pacientes que recibieron trasplante de hígado y a pacientes hemodializados, así como también en niños vacunados contra el HBV, que presentaban títulos protectores (igual o mayor a 10 mUI/ml) de anticuerpos anti-HBs. Estos estudios postulan que las mutaciones en el HBsAg son inducidas o seleccionadas por exposición prolongada a altos niveles de anticuerpos anti-HBs y que los cambios producidos en la polimerasa viral (debido a que el marco abierto de lectura de la envoltura se solapa con el de Pol) podrían afectar, en diferente medida, la sensibilidad del virus a la terapia antiviral.

Con respecto a mutantes del pre-S, se han descrito delecciones (de hasta 61 aminoácidos) que afectan la interacción -y el reconocimiento- con los anticuerpos específicos [Chen, 2018; Pollicino *et al.*, 2014]. También se han descrito mutantes de escape en las que no se sintetizaba la proteína de envoltura pre-S2 por estar mutado el codón de iniciación ATG correspondiente, formándose entonces una proteína pre-S1 de tamaño subnormal expresando diferentes epítopes. Asimismo, proteínas pre-S2 truncadas poseen actividad transactivadora de genes.

Variaciones en la región Pol: aunque la introducción de la terapéutica antiviral llevó a la selección de varias mutantes de Pol que confieren resistencia a la mayoría de las drogas antivirales utilizadas actualmente en el tratamiento de la hepatitis B crónica, se debería tener en cuenta que si bien las mutantes naturales de Pol son poco frecuentes, existen. Se entiende como mutante natural de Pol, aquella que es detectada antes de iniciar la terapéutica antiviral, capaz de conferir resistencia primaria natural al tratamiento específico.

d) Persistencia de formas genómicas estables del HBV dentro de la célula. Luego del ingreso del HBV a la célula, las nucleocápsides son direccionadas al núcleo donde es liberado el ADN genómico viral. Este ADN circular, laxo, parcialmente bicatenario es convertido en ADNccc, el cual es utilizado como templatado para la síntesis de los ARNm y del ARNpg. El ADNccc puede

permanecer en el núcleo celular por largos períodos de tiempo –meses o inclusive años– sin producción de los ARN antes mencionados y –por ende– sin replicación viral. Esta forma de ADNccc es de relevancia clínica, ya que se asocia a la resistencia viral al IFN [Ji y Hu, 2017].

e) Infección de sitios privilegiados. El HBV puede infectar otras estirpes celulares –además de los hepatocitos– como son los linfocitos, las CDs y las células neuronales. Si bien por estudios de microscopia electrónica se documentó la presencia de partículas subvirales en vesículas endocíticas así como ADN del HBV en el citoplasma de CDs infectadas, en estas mismas células no se detectaron cápsides ni tampoco viriones. Esto último demuestra que las CDs actuarían solamente como células presentadoras de antígeno (CPA) y no serían permisivas a la infección por HBV. A su vez, se ha demostrado la presencia de HBsAg y HBcAg por inmunohistoquímica en el citoplasma de neuronas, células de la glía y del endotelio vascular, así como ADN del HBV –detectado por PCR– en líquido cefalorraquídeo [Ilan *et al.*, 1996; Coffin *et al.*, 2011].

f) Integración del genoma viral al genoma celular. Si bien la integración del genoma del HBV al genoma celular no es un paso necesario para la replicación viral, este mecanismo permite también la persistencia viral. La integración del genoma viral puede producir deleciones y/o rearrreglos en el genoma celular, que a su vez, pueden causar una desregulación del ciclo celular. Por dicho motivo, se considera que este evento tiene importantes implicancias en el desarrollo del HCC. Si bien la integración ocurre al azar, los sitios con un contenido en GC similar al genoma viral podrían servir de blancos preferidos.

Cabe destacar que en la mayoría de los genomas del HBV integrados, los ORFs para las proteínas X y pre-S2 están conservados de tal manera que estos genes pueden ser transcritos normalmente. Ambas proteínas actúan regulando diferentes vías de transducción de señales con consecuencias tanto para la apoptosis como para la transformación celular.

Aproximadamente un 80-90% de los hepatocarcinomas exhiben secuencias de ADN del HBV integrado. El 61 % de los tumores hepáticos analizados hasta el presente muestran secuencias de ADN viral en los cromosomas 3, 11, 17 y 18 [Minami *et al.*, 2005; Hino *et al.*, 1986; Rogler *et al.*, 1985]. Se desconoce el significado de esta preferencia.

e. Proteína X del HBV (HBx)

Es un polipéptido multifuncional con actividad reguladora que modula la transcripción de genes virales y celulares afectando de forma directa o indirecta, la replicación y proliferación del virus (ver figuras I2, I3)[Slagle y Bouchard, 2018; Wang y Huang, 2017; Fu *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016]. Es la segunda proteína accesoria del HBV y se encuentra conservada en todos los hepadnavirus de mamíferos (pero no de aves). Se ha demostrado que esta proteína puede funcionar como una enzima con actividad de quinasas que puede:

(i) actuar como transactivadora de la transcripción, regulando positivamente a los promotores no sólo del HBV, sino también de otros virus como el HIV, y del genoma celular, a través de la interacción directa con factores de la transcripción como la subunidad RPB5 de la ARN-polimerasa II celular, la proteína de unión a TATA (TBP: *TATA binding protein*), ATF/CREB, AP-1, AP-2, NF- κ B, C/EBP, Oct-1, ERCC2, ERCC3 y el factor de transcripción nuclear HNF1 presente en células de estirpe hepatocitaria; (ii) afectar los puntos de control (*checkpoints*) del ciclo de división celular, la muerte celular y la carcinogénesis; (iii) unirse al factor supresor de tumores p53 e inactivarlo; (iv) transactivar ciertas moléculas de histocompatibilidad de clase II contribuyendo en parte a la patogénesis de la infección *in vivo*; (v) activar el receptor para andrógenos mediante su fosforilación a través de la vía de la quinasa c-Src, aumentando así la transcripción de genes regulados por andrógenos, de manera directamente proporcional a los niveles de esta hormona; (vi) iniciar la transformación celular transactivando genes como c-myc, c-fos y c-jun; (vii) activar distintas vías de transducción de señales como la cascada Ras/Raf/MAP quinasa y (viii) transactivar algunos de los genes que codifican para proteínas celulares de la familia de las ABC (*ATP-binding cassette*) como el gen *ABCB1/MDR1* que codifica para la glicoproteína P-gp/MDR1, alterando la sensibilidad a distintas drogas en las células infectadas [Lin y Zhang, 2017]. Estos dos últimos eventos se relacionan íntimamente ya que se ha podido determinar que la transactivación de la cascada de las Ras/Raf/MAP quinasas por parte de HBx es una de las causas de la generación del fenotipo MDR en las células hepáticas [Guan *et al.*, 2004] (figura I3).

Cabe destacar que la proteína celular Pin1 –una peptidil prolil isomerasa (PPIasa)– tiene una influencia crucial sobre HBx. Pin1 se une específicamente a grupos fosfato promoviendo su isomerización en un conjunto de proteínas que contienen los motivos Ser/Thr-Pro, lo que induce cambios en su conformación. La fosforilación de proteínas es un mecanismo crítico de regulación de su funcionalidad. Si bien era conocido que la mayoría de las quinasas celulares modifican la actividad y localización de proteínas críticas del ciclo celular (como la ciclina D1, β -cateninas, NF- κ B, c-Jun y p53), actualmente se postula que más que el evento de fosforilación *per se*, son críticos los cambios conformacionales promovidos por Pin1 luego de dicha fosforilación. HBx posee una secuencia aminoacídica Ser-Pro que posibilita su fosforilación por quinasas y su regulación por Pin1. Esta PPIasa estabilizaría HBx aumentando su capacidad transactivadora, y por ende, sinérgicamente a la actividad de la propia Pin1, inhibiría la apoptosis y promovería la proliferación celular. Se ha observado que un 20-50% de los HCC (en Occidente y China, respectivamente) exhibe sobreexpresión de Pin1.

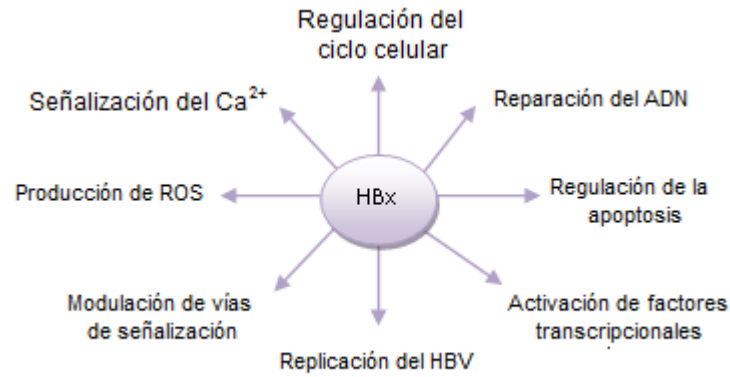


Figura 12. Funciones generales de HBx. Esta proteína modula una serie de señales, muchas de las cuales están interrelacionadas.
ROS: especies reactivas de oxígeno

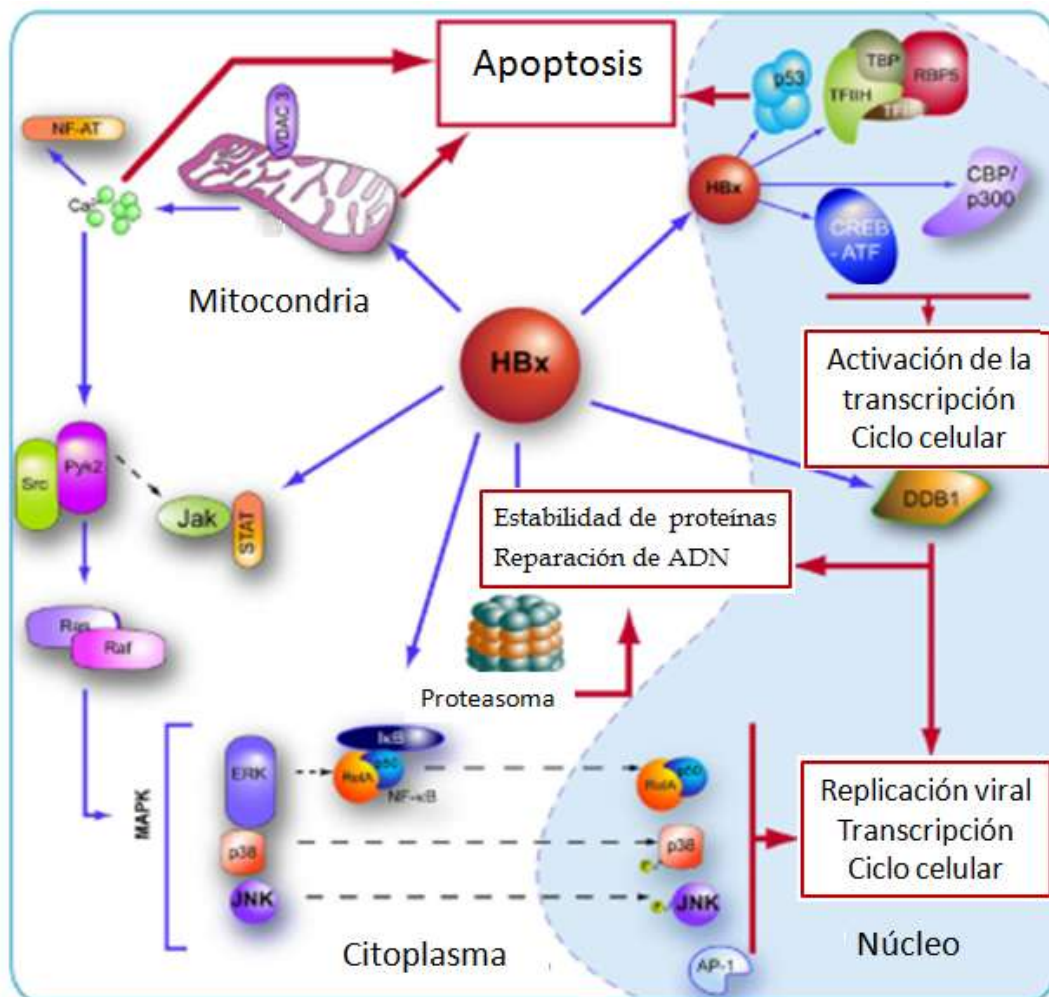


Figura 13. Múltiples actividades biológicas de HBx (adaptado de Neuveut et al., 2010).

Se ha postulado que la disfunción de HBx podría estar involucrada en la génesis del HCC (ver figura I4) [Al-Qahtani *et al.*, 2017]. Además, se observó que debido a su actividad de proteína transactivadora, podría producir alteraciones en la expresión de genes celulares que contribuirían a la transformación celular y a la immortalización de los hepatocitos. Diversos autores han documentado que las mutantes I127L/ K130M/ V131I exhiben una actividad transactivadora mayor que la proteína X salvaje, lo que implica que estas mutantes pueden contribuir significativamente a la hepatocarcinogénesis [Siddiqui *et al.*, 2017].

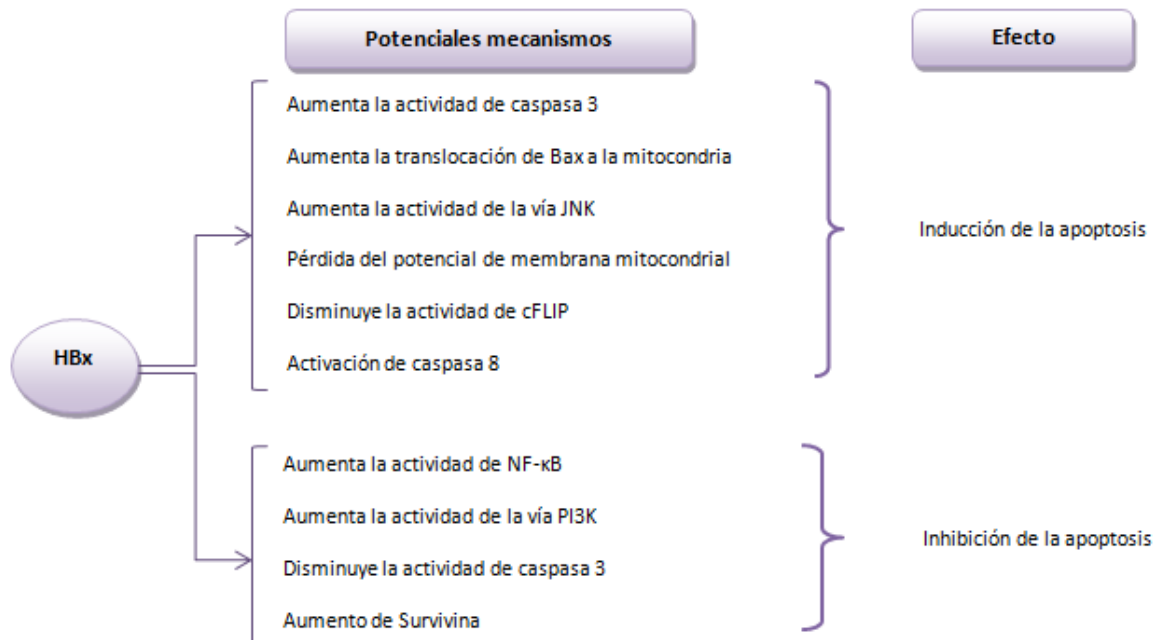


Figura I4. Potenciales mecanismos por los cuales HBx induce o inhibe la apoptosis en diferentes células.

f. Control de la enfermedad: prevención y tratamiento

- i. **Profilaxis.** La profilaxis para la hepatitis causada por el HBV puede ser activa o pasiva. En el primer caso, se utilizan vacunas preparadas con HBsAg (con o sin la adición de pre-S2), y en el segundo, gammaglobulina humana hiperinmune específica para HBV (HBIG), o –sólo si ésta no estuviera disponible– gammaglobulina estándar (también denominada normal).

Profilaxis activa: tanto las vacunas derivadas del plasma de portadores crónicos inactivos como las vacunas recombinantes, tienen como inmunógeno al HBs Ag. Esta proteína de envoltura contiene en su molécula al determinante

inmunológico “a” presente en todas las cepas de los 9 genotipos del HBV conocidos hasta el presente, por lo que su administración fue instituida para conferir inmunoprotección cruzada contra los mismos. Todas estas vacunas estimulan la síntesis activa de anticuerpos anti-HBs, confiriendo así inmunidad protectora a los individuos vacunados. También se les puede detectar en forma transitoria HBsAg en suero dentro de las 24 h de haber sido inmunizados. Otros inmunógenos en evaluación para ser potencialmente empleados como vacunas (profilácticas o terapéuticas) anti-hepatitis B se encuentran en diversas fases de ensayo [La Fauci *et al.*, 2016; Dembek *et al.*, 2018].

Desde 1992 la estrategia propuesta por la OMS para la prevención de la hepatitis B se basa en la vacunación universal de rutina de los recién nacidos y lactantes. En 2003, 151 de 192 países miembros (79%) habían adherido a tal iniciativa. Sin embargo, muchos países con alta endemicidad no introdujeron aún la vacunación anti-hepatitis B en sus respectivos planes de inmunización obligatoria. En otros, la cobertura de la inmunización es aún hoy baja. Países con alta endemicidad como China, estiman lograr el objetivo de una infección <1% de los niños menores de 5 años en un futuro próximo, aplicando el plan de tres dosis de vacuna (que incluye una al nacer) con una cobertura del 90% de los neonatos.

Según la OMS también sería útil vacunar a los adolescentes ya que protege contra la transmisión por contacto sexual o por uso de drogas inyectables. El personal de salud y otros grupos de riesgo como contactos familiares de individuos positivos para el HBsAg, enfermos sometidos a hemodiálisis, pacientes con trastornos hemorrágicos que reciben hemoderivados, viajeros internacionales que planean permanecer por más de 6 meses en zonas de alta o moderada endemicidad para el HBV también deberían vacunarse. El embarazo no constituye una contraindicación para recibir la vacuna contra la hepatitis B.

En el caso de neonatos hijos de madre HBsAg (+) se recomienda vacunarlos dentro de las 12 h de vida y administrarles simultáneamente HBIg hiperinmune. La segunda dosis (sin HBIg) se aplica no antes de los 2 meses de edad y no más allá de los 4, y finalmente la tercera dosis, también sin HBIg, se administra a los 6-18 meses de haberse aplicado la primera.

Desde 1992 rige en la Argentina la ley nacional 24151 que declara obligatoria la vacunación contra la hepatitis B para todas las personas que desarrollan actividades en el campo de la salud. A partir del 1° de noviembre del año 2000 se inició también en nuestro país por resolución 940/00 del Ministerio de Salud, la aplicación de la vacuna contra hepatitis B a todos los recién nacidos. En marzo de 2003, se incluyeron además para el calendario de vacunación a los preadolescentes, al cumplir los 11 años (junto con una dosis de la vacuna triple viral), en el marco del programa de Salud Escolar.

Profilaxis pasiva: la administración de anticuerpos dirigidos contra el HBsAg es efectiva (por un período breve) para conferir protección contra la infección.

Estas inmunoglobulinas pueden obtenerse mediante purificación a partir de mezclas de plasma de individuos “normales” (entre los cuales algunos pudieron haber padecido anteriormente la infección por HBV) o mezclas seleccionadas de plasma de individuos que exhiben altos títulos de anticuerpos anti-HBs por haber padecido una hepatitis B.

En el primer caso es posible detectar moderados títulos de anticuerpos contra los diversos virus que causan infecciones sistémicas en humanos provenientes de la región geográfica en la que se obtuvieron los (más de 1.000) plasmas: es la llamada inmunoglobulina estándar o normal.

Habitualmente el título de anticuerpos anti-HBs, medido por RIA, es igual a 100 UI/ml. En el segundo caso, la selección de plasma de individuos que curaron de su hepatitis B permite obtener una mezcla con un mayor título de anticuerpos específicos anti-HBs (100.000 UI/ml): es la inmunoglobulina específica o hiperinmune para el HBV (HBIG). La diferencia de los títulos de anticuerpos específicos para HBV entre la inmunoglobulina estándar y la HBIG hiperinmune implica la indicación selectiva de esta última con fines profilácticos. La Ig estándar sólo está indicada ante la carencia de la HBIG.

En el caso del neonato hijo de madre con HBsAg o de status desconocido, la administración de la HBIG y de la vacuna anti-hepatitis B debe hacerse dentro de las 12 h de ocurrido el nacimiento [Wei *et al.*, 2018; Gong y Liu, 2018]. Se recomienda la administración de 1-2 ml de HBIG (200 UI/ml) según la OMS y de 0,5 ml según el CDC (EE.UU.). En el caso de que sea hijo de una madre con HBsAg, ello reduce el riesgo de que el recién nacido desarrolle una infección persistente en un 70%. Con dicho objetivo, la inmunización anti-hepatitis B pasiva y activa combinada es eficaz en aproximadamente un 90%.

ii. Tratamiento antiviral. Generalmente, el tratamiento antiviral no está indicado en pacientes con hepatitis B aguda dado que gran parte de los adultos inmunocompetentes infectados resuelven favorablemente y en forma espontánea la infección. En estos pacientes, el tratamiento es más bien sintomático. En cambio, los pacientes con hepatitis B crónica con elevados niveles de aminotransferasas séricas y replicación viral activa sí tienen indicado un tratamiento antiviral. Desafortunadamente, hasta el día de hoy no se dispone de antiviral alguno para un tratamiento eficaz de la hepatitis B crónica que logre erradicar al HBV del organismo en todos los casos [Yoo *et al.*, 2018; Bloom *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018]. Hasta el presente se han ensayado diversos protocolos para tratar a los individuos virémicos utilizando sólo IFN- α –actualmente pegilado (PegIFN- α) o en combinación con análogos de nucleósidos/nucleótidos (ANs) los cuales se muestran en la figura I5.

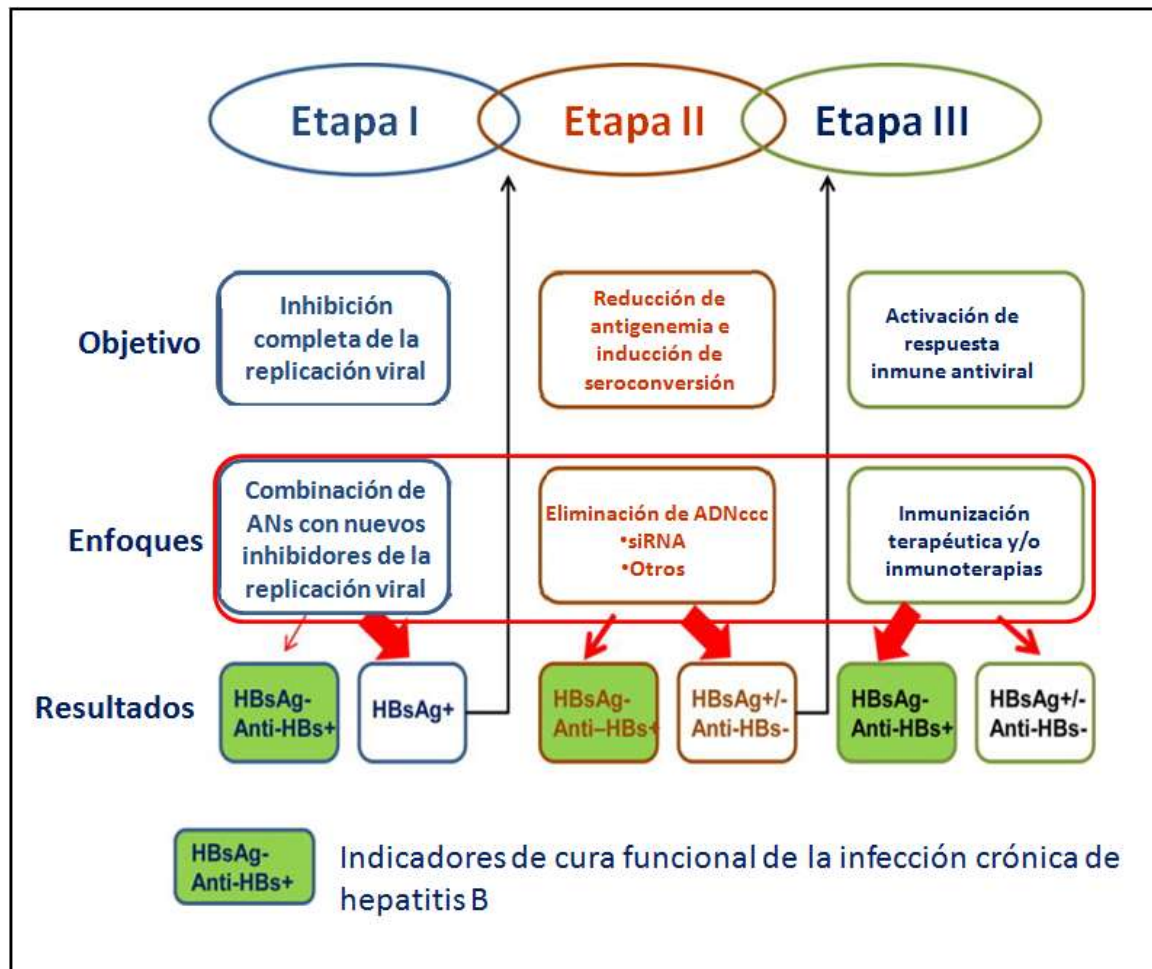


Figura 15. Ilustración del programa terapéutico en tres etapas de la infección crónica por HBV. La contribución de los esfuerzos actuales de descubrimiento de fármacos en la cura de la hepatitis B crónica se destaca en el recuadro rojo. El grosor de las flechas indica la probabilidad de los resultados (adaptado de Tang et al., 2017).

IFN- α : no tiene una actividad antiviral directa. Actúa provocando en la célula hospedadora, la elaboración de proteínas con actividad antiviral con lo que, en forma indirecta, inhibe la replicación viral. También presenta efectos anti-fibróticos e inmunomoduladores que modifican y favorecen la respuesta inmunitaria frente a la infección viral. Existen preparaciones comerciales de IFN obtenidas por ingeniería genética. La pegilación o unión del polietilenglicol a una molécula de IFN- α permite retrasar su eliminación, prolongar su actividad y, por lo tanto, mejorar su rendimiento. Se observó que se obtienen mejores resultados clínicos con el IFN- α pegilado que con el IFN- α sin pegilar. El tratamiento de la

infección crónica por HBV con IFN- α o con Peg-IFN- α se recomienda en pacientes con enfermedad hepática compensada en los que se detecte HBsAg, HBeAg, y ADN viral en suero, con valores de aminotransferasas altos y sin evidencia de insuficiencia hepática avanzada. La exacerbación subclínica de la hepatitis observada al inicio del tratamiento en pacientes que responden sugiere que el efecto del IFN estaría mediado por un aumento de la respuesta inmune contra el virus promovida por el efecto de linfocitos T citotóxicos. Tras el tratamiento con IFN se logra la seroconversión a anti-HBe, la eliminación del ADN viral sérico, y la mejoría bioquímica e histológica hasta en un 40% de los casos, a veces meses después de cesar el tratamiento. Las remisiones en la hepatitis B crónica inducidas por el IFN persisten en más del 80% de los pacientes tratados; a menudo son seguidas por pérdida del HBsAg, mejoría o estabilización histológica, riesgo disminuido de complicaciones relacionadas con el hígado y de la mortalidad. En el caso de pacientes con anti-HBe y ADN viral detectable (variante "HBe-*minus*") la respuesta es menor, por lo que puede requerirse prolongar el tratamiento y aumentar la dosis.

Análogos de nucleósidos y de nucleótidos (ANs): en general, actúan bloqueando la transcriptasa inversa por un mecanismo competitivo y como terminadores de la síntesis de la cadena del ADN viral. Al competir con el sustrato natural inhiben funcionalmente las tres actividades de la polimerasa del HBV (dominio transcriptasa inversa): **i)** iniciación de la transcripción; **ii)** transcripción inversa del ARN mensajero pregenómico (síntesis de la cadena de ADN negativa del HBV); y **iii)** síntesis de la cadena positiva. Los ANs aprobados en Europa para el tratamiento del HBV incluyen: lamivudina (LAM), adefovir dipivoxil (ADV), entecavir (ETV), telbivudina (TBV), tenofovir disoproxil fumarato (TDF) y tenofovir alafenamide (TAF) [*European Association for the Study of the Liver (EASL) 2017 Clinical Practice Guidelines*]. Estos se pueden clasificar en aquellos que generan una rápida resistencia del HBV al tratamiento (LAM, ADV, TBV) y en los que se los asocia a una baja generación de resistencia al tratamiento antiviral (ETV, TDF, TAF). Esta resistencia está dada por la selección de mutaciones en la polimerasa viral, lo que genera variantes virales con mayor *fitness*. La mayor ventaja del tratamiento con un AN que genera baja resistencia al tratamiento (ETV, TDF, TAF) es su alta eficacia antiviral a largo plazo que conduce a niveles de ADN del HBV indetectables en la gran mayoría de los pacientes. Es por esto que la administración de este grupo de ANs es el tratamiento de elección independientemente de la gravedad de la enfermedad hepática. El régimen de preferencia es la monoterapia con ETV, TDF o TAF.

La monoterapia con el IFN- α pegilado no es muy efectiva y está limitada por la gran cantidad de efectos adversos que presenta en forma dosis-dependiente. Además, la mayoría de los pacientes que reciben este tratamiento permanece crónicamente infectada y con riesgo de desarrollar cirrosis hepática y HCC. La monoterapia con los distintos ANs (lamivudina, adefovir, telbivudina, entecavir y tenofovir) tampoco resulta del todo satisfactoria. Por un lado, con el

uso de los mismos se han obtenido resultados prometedores en cuanto al efecto antiviral y a que son bien tolerados por los escasos efectos adversos que presentan. Pero por otra parte, se observó que el tratamiento a corto plazo con estos ANs no es suficiente para erradicar la infección viral, y que el tratamiento a largo plazo, además de ser económicamente muy costoso está asociado con la emergencia de mutantes resistentes a los mismos, como las mutantes YMDD de la transcriptasa inversa viral (ver figuras I6, I7).

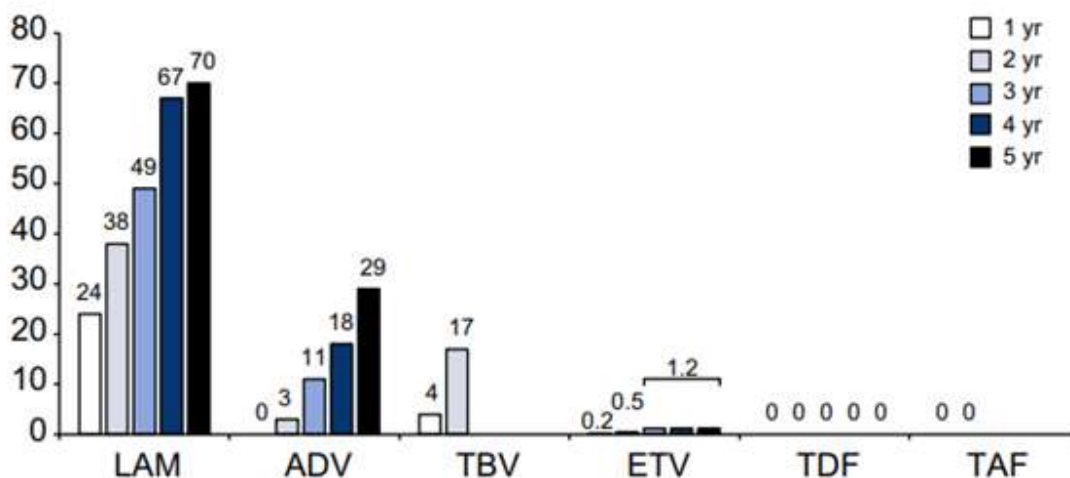


Figura I6. Incidencia acumulada de resistencia a Lamivudine (LAM), adefovir (ADV), telbivudina (TBV), entecavir (ETV), tenofovir (TDF) y tenofovir alafenamida (TAF) en ensayos en pacientes crónicamente infectados con HBV y naïve de tratamiento. No se registró evidencia de cepas resistentes luego de 8 años de tratamiento con tenofovir. yr años de tratamiento (adaptado de European Association for the Study of the Liver, 2017).

Variante de HBV	LAM	LDT	ETV	ADV	TDF/TAF
Wild-type	S	S	S	S	S
M204V	R	S	I	I	S
M204I	R	R	I	I	S
L180M + M204V	R	R	I	I	S
A181T/V	I	I	S	R	I
N236T	S	S	S	R	I
L180M + M204V/I ± I169T ± V173L ± M250V	R	R	R	S	S
L180M + M204V/I ± T184G ± S202I/G	R	R	R	S	S

Figura I7. Resistencia cruzada entre diversos antivirales utilizados en el tratamiento de la hepatitis B crónica. En la primera columna se muestran los cambios aminoacídicos asociados a resistencia. S: sensible; I: sensibilidad reducida; R: resistente. LAM: lamivudina; LDT: telbivudina; ETV: entecavir; ADV: adefovir; TDF/TAF: tenofovir/ tenofovir alafenamida (adaptado de European Association for the Study of the Liver, 2017).

Entre los factores que dificultan un tratamiento satisfactorio merecen señalarse dos: la presencia nuclear del ADNccc del HBV y, en etapas tardías, la transcripción del ADN viral integrado al genoma celular. Ninguno de los antivirales utilizados actualmente para el tratamiento de la hepatitis B crónica logra erradicar al ADNccc por completo, lo que contribuye a la reaparición de la actividad viral tras el cese del tratamiento (figura I8) [Tang *et al.*, 2017; Revill y Locarnini, 2016].

Los objetivos generales de la terapéutica son: **i)** inducir el cese de la replicación viral (determinado mediante negativización del ADN viral sérico y la desaparición del HBeAg circulante); **ii)** normalizar el nivel de transaminasas séricas; y **iii)** mejorar la histología hepática.

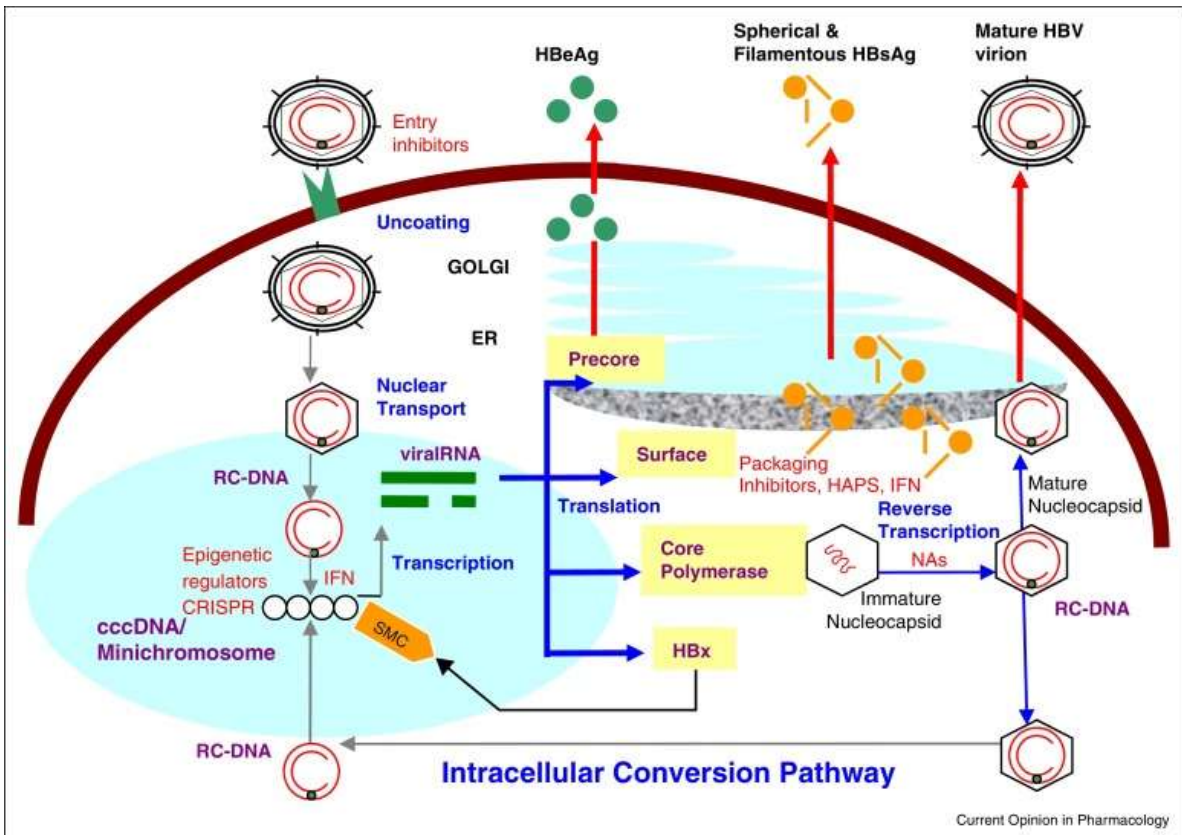


Figura I8. Ciclo de replicación del Virus Hepatitis B (HBV) donde se muestra los sitios de acción de los antivirales. pdcDNA (ADN parcialmente doble cadena), cccDNA (ADN circular covalentemente cerrado), pgARN (ARN pre-genómico) y RC-DNA (ADN circular relajado). Tomado de Revill y Locarnini, 2016.

Como se mencionó anteriormente, hasta el día de hoy no se dispone de un tratamiento eficaz para la hepatitis B crónica que logre erradicar totalmente al HBV del hospedador. Desde hace varias décadas se están investigando los mecanismos moleculares que favorecen la falla en la terapéutica anti-HBV al

documentarse mutaciones en los sitios blanco de acción de los antivirales (ej. dominio de transcriptasa inversa de la polimerasa viral), pero sólo hace pocos años se está asociando dicha resistencia a la disfunción en la actividad de transportadores celulares. Modificaciones en la expresión y/o actividad funcional de dichas bombas transmembrana -denominadas Proteínas ABC (*ATP binding cassette transporters*)- producen una alteración en la sensibilidad a las drogas en las células infectadas. En el primer caso la droga incorporada a la célula hospedadora no tendría efecto alguno sobre la cepa viral, en el segundo caso la actividad aumentada de ciertas bombas ABC no permitiría que se alcance la concentración de droga antiviral necesaria y suficiente dentro de la célula para que sea eficaz, generando el fenotipo MDR (*Multidrug Resistance*). En la actualidad hay un notable interés en el desarrollo de nuevos compuestos que puedan prevenir o revertir la resistencia a múltiples drogas [Boumendjel *et al.*, 2005]. Como se mencionó anteriormente este fenotipo MDR se ha documentado tanto en la terapia antiviral como en la anticancerosa y es una causa muy importante de falla en la terapéutica del HBV y del HCC.

I. 2. SUPERFAMILIA DE TRANSPORTADORES ABC

a. Estructura y función de los transportadores ABC

El transporte a través de la membrana lipídica de moléculas específicas es una función esencial de todos los seres vivos, y un gran número de transportadores específicos han evolucionado en la manera de llevar a cabo esta función.

Las proteínas ABC (*ATP-binding cassette*) forman una de las familias más grandes y versátiles de moléculas de transporte activo [Thomas y Tampé, 2018; Dean *et al.*, 2001]. Estos transportadores se encuentran en todos los organismos, desde procariotas a eucariotas [Annilo *et al.*, 2006; Davidson y Chen, 2004] y sus funciones características abarcan desde el transporte de iones hasta de macromoléculas usando la hidrólisis del ATP como fuente de energía [Szákacs *et al.*, 2006; Dassa y Bouige, 2001].

Los genes *ABC* son esenciales para algunos procesos celulares, y mutaciones en los mismos contribuyen a distintos desórdenes genéticos incluyendo fibrosis quística, enfermedades neurológicas, defectos en el transporte de colesterol y ácidos biliares, anemia y resistencia a drogas, entre otras.

Representan una superfamilia de 49 proteínas, dividida en 7 subfamilias (tabla I1) las cuales están determinadas por la organización de sus dominios, es decir según el número y la combinación de los dominios transmembrana (TMD o MSD: *transmembrane domain* o *membrane spanning domain*) y los dominios de unión a ATP (NBD, *nucleotide binding domain*).

Tabla 11. Clasificación de los diferentes transportadores ABC humanos

Subfamilia	Nombre alternativo	Número de proteínas	Función principal	Ejemplos
ABCA	ABC1	12	Responsable del transporte de colesterol y otros lípidos	ABCA1, ABCA12
ABCB	MDR	11	Algunos se encuentran en la BHE, hígado, y transportan péptidos y bilis	ABCB1 (P-gp o MDR1) ABCB5
ABCC	MRP	13	Transporte de iones, secreción de toxinas y transducción de señales	ABCC6
ABCD	ALD	4	Transporte de sustancias en los peroxisomas	ABCD1
ABCE ABCF	OABP GCH20	1 3	Regulan principalmente la síntesis o expresión de proteínas (no son transportadores, sino dominios de unión al ATP derivados de la familia ABC)	ABCE ABCF1 ABCF2
ABCG	White	5	Transporte de lípidos, drogas, bilis, colesterol y otros esteroides	ABCG1 BCRP (ABCG2)

BHE: barrera hemato-encefálica

En los mamíferos, las proteínas ABC funcionalmente activas constan de 4 dominios característicos, dos TMD hidrofóbicos (TMD1 y TMD2) y dos NBD hidrofílicos (NBD1 y NBD2). Estos cuatro dominios pueden estar formados por una cadena polipeptídica (transportadores completos o *full transporters*) o en dos proteínas separadas (transportadores medios o *half transporters*) (figura I9.A). En este último caso, los transportadores ABC se vuelven funcionalmente competentes luego de una dimerización específica. Los dos TMD forman el sitio de unión al ligando y proveen la especificidad por el sustrato, mientras que los dos NBD unen e hidrolizan ATP para impulsar la translocación de dicho ligando. Los NBDs, pero no los TMDs, son homólogos en toda la familia de las ABC y tienen dos motivos característicos como el Walker A y el Walker B; y otros motivos, como el ABC *signature* que es único de la subfamilia MDR (figura I9.B). Algunas proteínas ABC contienen dominios adicionales o proteínas asociadas (TMD0), como la mayoría de los miembros de la subfamilia MRP (ABCC), cuya función aún se desconoce.

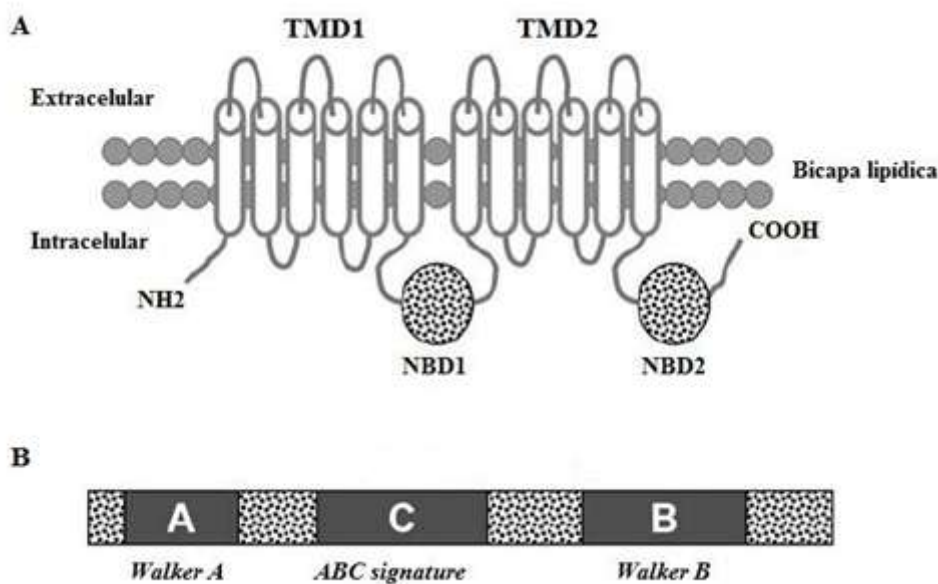


Figura 19. A) Diagrama de una proteína ABC típica embebida en la bicapa lipídica. La proteína contiene dos TMD y dos NBD. **B)** El NBD del transportador ABC contiene el Walker A y el Walker B que se encuentran en todas las ABC. Además se encuentra el motivo C (ABC signature).

Las proteínas ABC juegan un papel relevante en el transporte tanto de endo- como de xenobióticos. Cada ABC presenta un amplio espectro de sustratos que abarcan desde conjugados de glutatión (GST), glucurónidos y de sulfato, análogos de nucleótidos, sales biliares, esteroides, prostaglandinas y fármacos tales como el cisplatino y las antraciclinas (doxorubicina y daunorrubicina).

Además de la amplia especificidad de sustrato, cada vez existen más compuestos que se unen a los transportadores ABC, sin ser transportados, y muchos de ellos actúan como competidores.

En la actualidad hay un notable interés en el desarrollo de nuevos compuestos que puedan prevenir o revertir la resistencia a múltiples drogas. Como se mencionó anteriormente este fenotipo MDR se ha documentado tanto en la terapia antiviral como en la anticancerosa y es una causa muy importante de falla en la terapéutica del HBV y del HCC [Robey *et al.*, 2018].

b. Resistencia al tratamiento con antivirales y antitumorales asociada a los transportadores ABC

La MDR es mediada por una serie de alteraciones moleculares y celulares. Éstas incluyen la disminución en la acumulación intracelular del fármaco, cambios en los niveles de expresión de proteínas “*target*”, mutaciones que disminuyen la unión del fármaco a su sitio de acción, el secuestro del fármaco en vesículas ácidas, el metabolismo alterado de los fármacos, el aumento a la tolerancia al daño celular y la disminución de la señalización de la apoptosis [Gottesman *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2012].

En este trabajo de tesis el término MDR hará referencia al primero de los mecanismos descritos, como es la disminución en la acumulación intracelular del fármaco por aumento en la expresión y/o actividad de las bombas ABC. En los seres humanos, los tres tipos principales de proteínas ABC involucrados en MDR incluyen miembros de las sub-familias ABCB (ej: P-gp/MDR1/ABCB1), ABCC (ej: MRP1/ABCC1) y ABCG (ej: BCRP/ABCG2) [Mohammad *et al.*, 2018]. El estudio de la presente tesis se centró principalmente en los transportadores BCRP, MRP4 y MRP5; y en menor medida en MDR1 y MRP1.

i. Proteína BCRP

BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*, MXR/ABCG2) es una proteína de 72 kDa (figura I10) compuesta por 665 aminoácidos, identificada por primera vez en 1998 en una línea celular MDR de cáncer de mama (MCF7/Adr-Vp) que no expresa MDR1 y MRP1 [Doyle *et al.*, 1998]. Sin embargo, en la actualidad no hay evidencias de que este transportador se exprese preferentemente en tejido de mama normal o neoplásico, y su relevancia clínica aún no está bien establecida.

A diferencia de MDR1 y MRP1, BCRP es un transportador medio ya que contiene solo un dominio TMD y un NBD. Se ha demostrado que BCRP se encuentra en la membrana plasmática en forma de homodímero unido a través de residuos de cisteínas unidas por puentes disulfuro (figura I11).

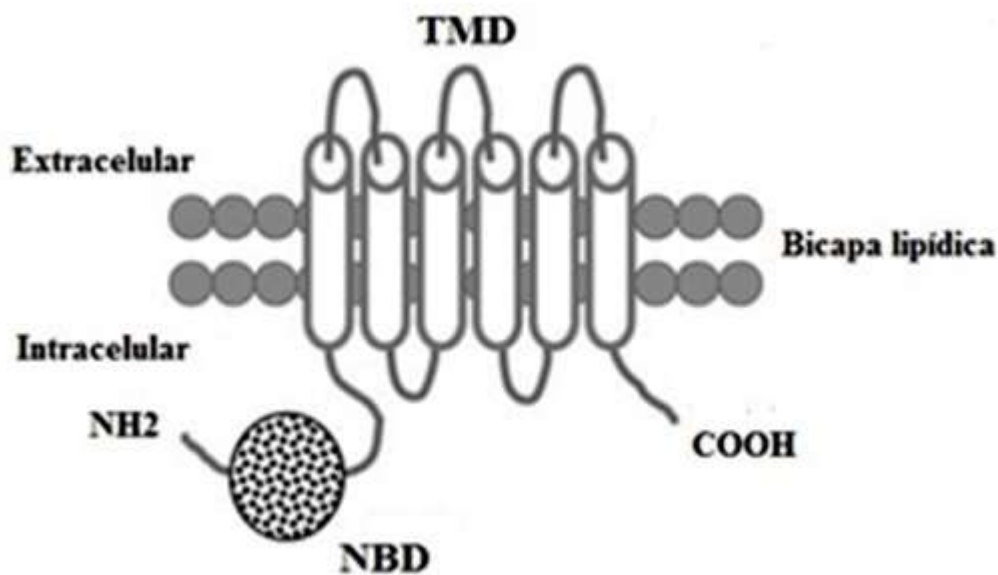


Figura I10. Esquema de BCRP en el que se detalla su estructura de transportador medio, con un TMD de 6 pasos transmembrana y un NBD en el extremo N- terminal (adaptado de Ishikawa y Nakagawa, 2009).

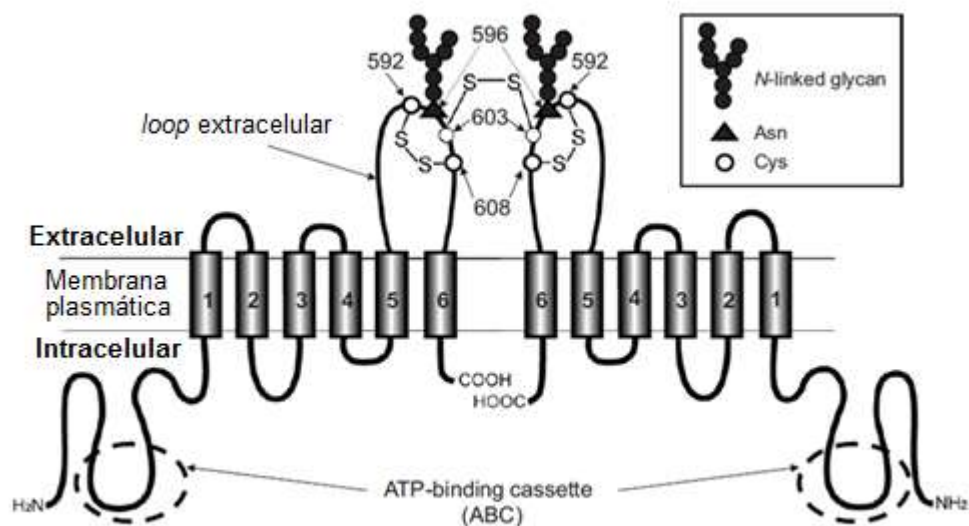


Figura I11. Ilustración esquemática de la estructura de la proteína BCRP y la localización de los aminoácidos cisteína (Cys) y asparagina (Asn) involucrados en su dimerización (adaptado de Ishikawa y Nakagawa, 2009).

BCRP está presente en una gran variedad de tejidos (figura I12), siendo más abundante en el hígado, epitelio intestinal, placenta y BHE [Liu, 2009].

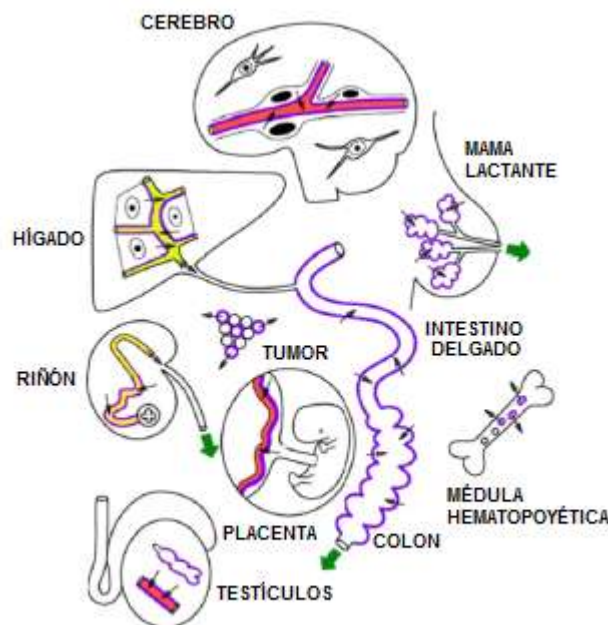


Figura I12. Distribución tisular de BCRP. La presencia de este transportador se indica en violeta. Las flechas negras indican la dirección de transporte de sustratos por BCRP, mientras que las flechas verdes indican la excreción neta de los sustratos de BCRP del organismo (adaptado de Vlaming *et al.*, 2009).

Se expresa en la membrana apical de los hepatocitos, células epiteliales del intestino y del riñón desde donde bombea una gran variedad de compuestos endógenos y exógenos hacia el exterior de la célula. Debido a su actividad en estos órganos excretores, BCRP puede tener un importante efecto sobre la cinética de muchos fármacos y sus metabolitos, aumentando su excreción y limitando su absorción desde el lumen intestinal a la circulación [Maliepaard *et al.*, 2001; Mottino *et al.*, 2000]. Cisternino y col., demostraron que tanto la expresión del ARNm de *BCRP* como su proteína, aumentaban en ratones *knock-out* para *MDR1* respecto de ratones salvajes, sugiriendo un mecanismo de compensación ante la falta de *MDR1* [Cisternino *et al.*, 2004].

BCRP se localiza también en la zona apical de las células epiteliales alveolares de la glándula mamaria (figura I12), principal sitio de producción de leche materna. Además, se ha documentado que la expresión de BCRP es fuertemente inducida durante el embarazo y la lactancia [Jonker *et al.*, 2005] y tal vez esto justifique la hipótesis de que además de ser un transportador de xenobióticos, también puede estar involucrado en la transferencia de nutrientes de la madre al lactante, a través de la leche.

De acuerdo a su rol en la desintoxicación, BCRP se ha encontrado sobre-expresada en numerosas líneas celulares de cáncer y tumores humanos, especialmente adenocarcinomas del tracto digestivo, pulmón y endometrio [Diestra *et al.*, 2002]. En estudios retrospectivos, se encontró que la tasa de respuesta a la quimioterapia en los pacientes se correlacionaba con la expresión de BCRP [Peña- Solórzano *et al.*, 2017; Uggla *et al.*, 2005; Yoh *et al.*, 2004].

En los HCCs, BCRP se encuentra aumentada y confiere resistencia a un rango estrecho de agentes antitumorales, comparado con MDR1 y MRP1. Sin embargo, el espectro incluye antraciclinas como la doxorrubicina y daunorrubicina, mitoxantrona y los inhibidores de la topoisomerasa I como la camptotecina. Por otro lado, BCRP no confiere resistencia a los alcaloides de la vinca, paclitaxel o cisplatino [Allen y Schinkel, 2002].

Además, existen evidencias de que BCRP es capaz de alterar la absorción, el metabolismo y la toxicidad de los inhibidores de tirosinas quinasas, como imatinib (STI-571) y gefitinib (ZD 1839) [Ozvegy-Laczka *et al.*, 2005].

Hasta la actualidad se han identificado 80 polimorfismos de base única (SNP: *single nucleotide polymorphism*) no sinónimos [dbSNP database] del gen *ABCG2*. De dichos SNP la variante no sinónima más extendida es el cambio de aminoácido Gln141Lys (rs2231142), el cual fue extensamente estudiado tanto *in vitro* como en estudios clínicos. Como se muestra en la figura I. 13 dicha proteína variante (Gln141Lys) es reconocida como una proteína incorrectamente plegada por lo que es degradada en el proteasoma -ubiquitinización mediante-, resultando esto en una baja expresión de BCRP Gln141Lys en la membrana celular, en comparación con BCRP *wild type*. La frecuencia del alelo Gln141Lys es mayor en Asia (30–60%) que en América (5–10%). Si bien se han reportado otros SNP en *ABCG2* (que producen las variantes Val12Met, Gln126stop, Glu334stop) estos polimorfismos presentan una frecuencia muy baja en la población caucásica (1,9–3,0%). Es por esto último que el SNP Gln141Lys es considerado el polimorfismo clínicamente más importante.

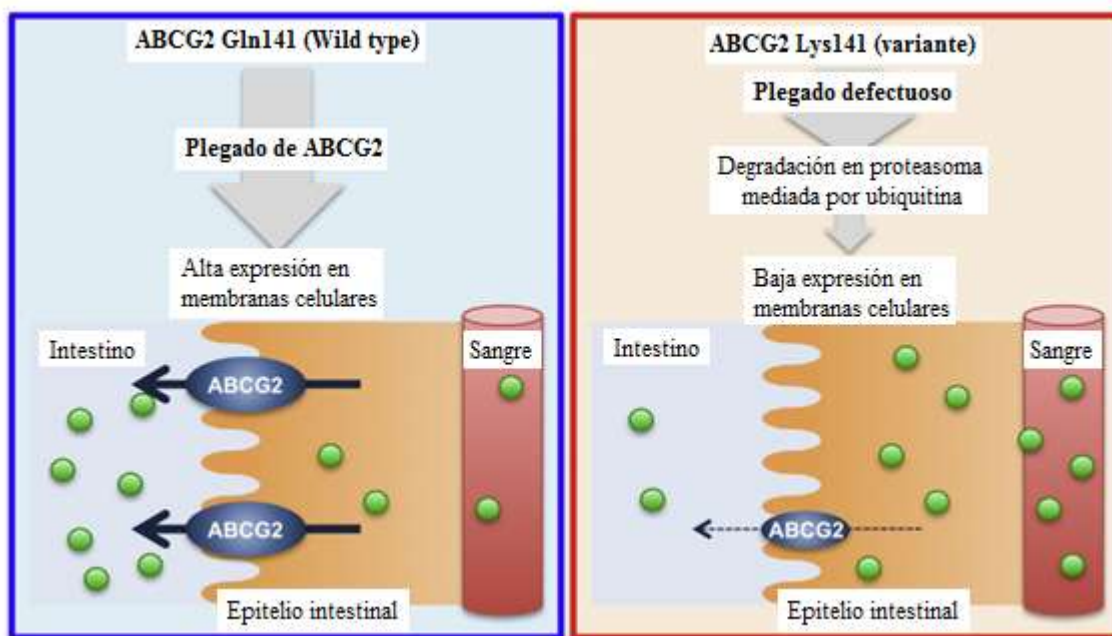


Figura 113. Diferencias en los niveles de expresión de la proteína ABCG2 c.421C>A y su efecto en la farmacocinética. La variante Lys141 resulta en una proteína BCRP/ABCG2 incorrectamente plegada que es degradada en el proteasoma dando como resultado la baja expresión de dicho transportador en la membrana celular y una alta concentración plasmática del sustrato de BCRP (círculos verdes), comparado con la expresión de la proteína wild-type (Gln141) (adaptado de Hira y Terada, 2018).

ii. Proteína MRP4

La proteína MRP4, codificada por el gen *ABCC4*, fue descubierta en 1997 por Kool y colaboradores como una proteína homóloga de MRP1 y MRP2 [Kool *et al.*, 1997]. El gen *ABCC4* se localiza en el cromosoma 13 (13q32.1) y presenta tres variantes de *splicing* (isoformas 1, 2 y 3), de las cuales la isoforma 1 es la variante principal y codifica una proteína de 1325 aminoácidos. Esta proteína presenta varios dominios: dos dominios de membrana (MSD), dos dominios de unión a nucleótidos (NBD) y un motivo PDZ en el extremo C-terminal (figura 114). Los estudios acerca de la estructura de MRP4 revelan un sitio único de entrada y salida, que bombea sustratos hacia el exterior utilizando la energía liberada de la hidrólisis de ATP [Sauna *et al.*, 2004; El-Sheikh *et al.*, 2008; Ravna y Sager, 2008].

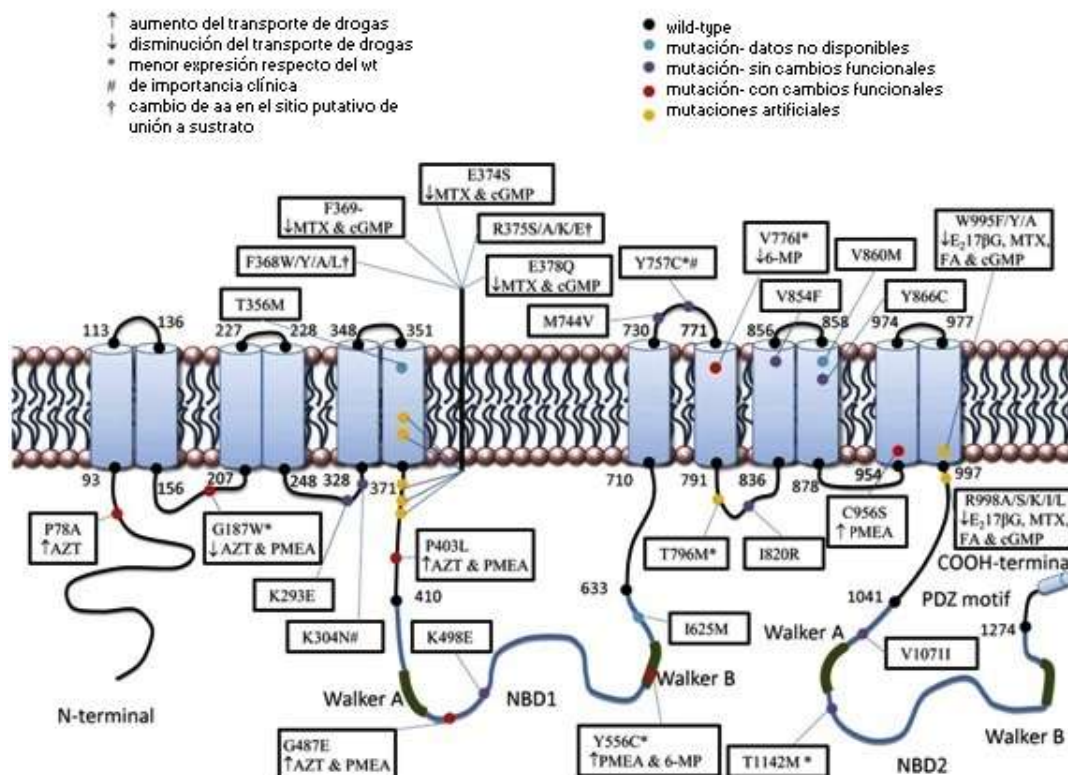


Figura I14. Diagrama de la estructura de MRP4 y sus mutaciones. MRP4 contiene dos dominios de membrana (MSD), dos dominios de unión a nucleótidos (NBD) y un motivo PDZK en el extremo C-terminal, lo cual forma una estructura central con capacidad de bombeo. Se reportaron 17 mutaciones no sinónimas in vivo y en observaciones clínicas, algunas de ellas, de importancia clínica (adaptado de Wen et al., 2015).

Comparada con otras MRPs, MRP4 muestra una distribución más amplia (riñón, hígado, intestino, plaquetas, músculo liso, corazón, barrera hematoencefálica, etc.), y es capaz de transportar numerosas moléculas de señalización como AMPc, GMPc, ADP, prostaglandinas y leucotrienos, además de ácido fólico eicosanoides, ácidos biliares, urato y hormonas esteroideas conjugadas [van Aubel et al., 2002; Jedlitschky et al., 2004; Rius et al., 2008; Russel et al., 2008]. Como resultado, MRP4 juega un papel crucial en la comunicación intercelular tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Numerosos estudios han demostrado la participación de MRP4 en la agregación plaquetaria, migración celular, proliferación, angiogénesis y contracción de los cardiomiocitos, además de participar en la progresión tumoral [Huynh et al., 2012]. Algunos reportes clínicos y estudios farmacogenómicos también respaldan estos roles funcionales de MRP4. Por otra parte, se ha demostrado que las interacciones del fármaco sobre MRP4, así como sus variaciones

genéticas, pueden estar vinculadas a una alteración en la eficacia del fármaco o su toxicidad.

Además MRP4 tiene un rol clave en la absorción, disposición y excreción de un amplio rango de drogas como antivirales (adefovir, tenofovir, ganciclovir), antibióticos (cefalosporinas), diuréticos (furosemida, hidroclorotiazida), antihipertensivos (olmesartan) y antitumorales (metotrexato, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, topotecan) [Lee *et al.*, 2000; Ray *et al.*, 2006; Ci *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2007; Krishnamurthy *et al.*, 2008].

MRP4 se expresa en numerosos tejidos, pero se regula de manera tejido-específica. En el hígado, el nivel de expresión de MRP4 es muy variable [Gradhand *et al.*, 2008] y es regulado transcripcionalmente por CAR (*constitutive androstane receptor*) [Assem *et al.*, 2004], PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor*) [Moffit *et al.*, 2006], Nrf-2 (*NFE2-related factor 2*) y Ahr (*aryl hydrocarbon receptor*) [Xu *et al.*, 2010] mediante la unión a su región promotora. El receptor nuclear CAR transloca al núcleo después de su activación y se une al elemento sensible a ER6 en el promotor de *ABCC4*, mientras que los heterodímeros formados por FXR (*farnesoid xenobiotic receptor*) activado y RXR (*retinoid X receptor*) se unen al elemento ER8, el cual se superpone con ER6 [Renga *et al.*, 2011]. Por lo tanto, la activación de FXR produce el desplazamiento de CAR y revierte la inducción de la expresión de MRP4.

Como miembro de la familia de transportadores ABC, MRP4 se expresa principalmente en la membrana de células polarizadas y su actividad está regulada mediante internalización. Al igual que otros miembros de la familia ABC (por ej., MRP2 y CFTR), el extremo C-terminal de MRP4 contiene una secuencia de aminoácidos -ETAL-, que pertenece al motivo de interacción de clase I PDZ (X- [S/T]-XA, donde X indica una aminoácido inespecífico y A indica un aminoácido hidrofóbico) y puede interactuar con proteínas adaptadoras *PDZ-based* [Russel *et al.*, 2008]. A través de esta interacción PDZ-PDZ, las proteínas NHERF1 [Hoque y Cole, 2008] y SNX27 [Hayashi *et al.*, 2012] promueven la internalización de MRP4 y de ese modo regulan negativamente la expresión de la superficie celular, mientras que NHERF3 [Park *et al.*, 2014] estabiliza MRP4 en la superficie celular, mediante la reducción de su internalización (figura I.15).

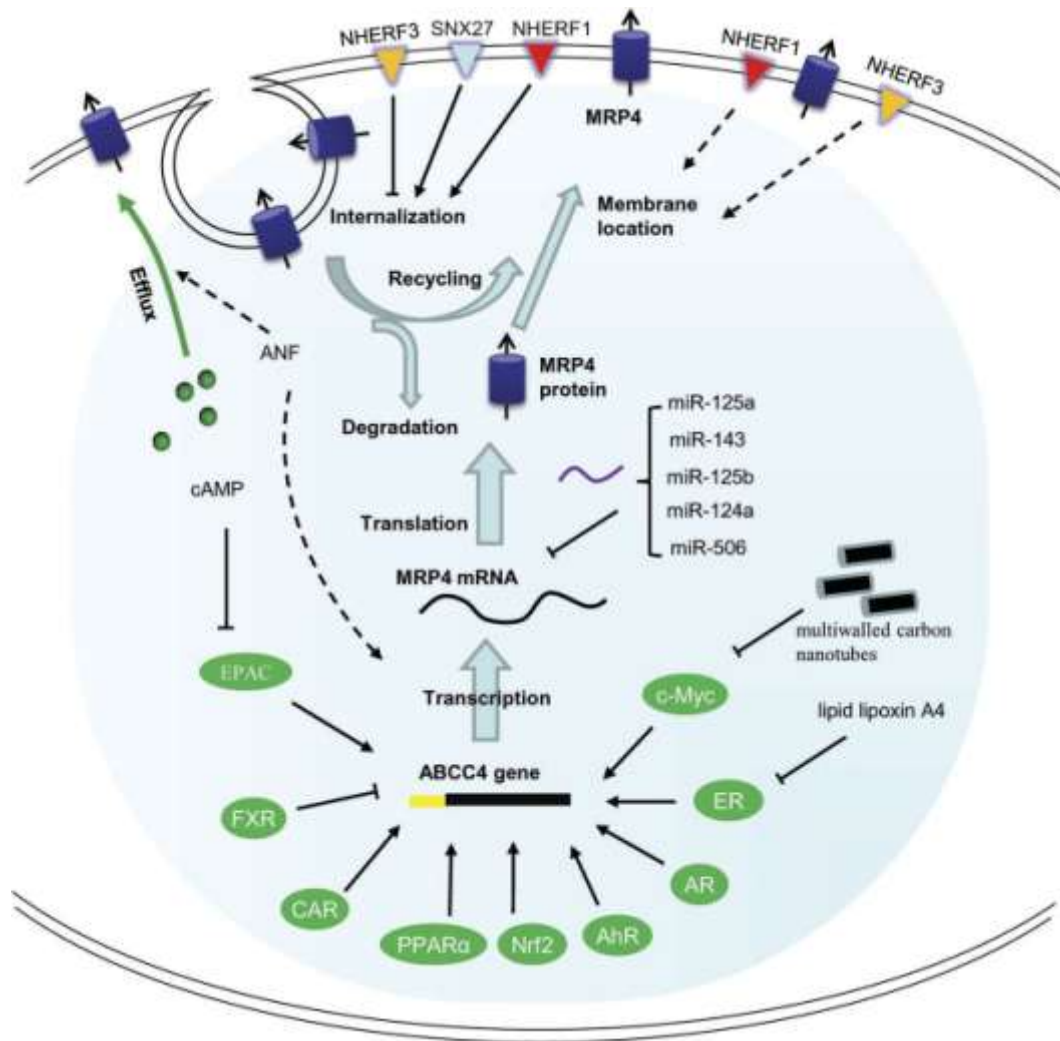


Figura I15. Ilustración esquemática de la vía de regulación de MRP4. CAR, PPARα, NFE2-related factor 2 (Nrf2), aryl hydrocarbon receptor (AhR), androgen receptor (AR), estrogen receptor (ER) y farnesoid xenobiotic receptor (FXR) son los primeros en participar en el control de la transcripción de ABCC4, aunque los factores de transcripción implicados son distintos entre los diferentes tipos de células y tejidos. Además, distintos miRNAs suprimen la traducción de la proteína MRP4 a través de la unión a la región 3'-no codificante del ARNm. Por otro lado, la localización de MRP4 en la membrana plasmática puede regularse por internalización a través de las funciones de NHERF1/3 y SNX27. ANF: atrial natriuretic factor (tomado de Wen et al., 2015).

La regulación de MRP4 en las células tumorales es muy diferente de la de los tejidos normales (figura I.16). c-Myc es un miembro importante de la familia de protooncogenes Myc que controla múltiples funciones celulares mediante la regulación transcripcional de una red de genes. Se ha demostrado que varios otros genes ABC son regulados por c-Myc en neuroblastomas, leucemia mielógena y células epiteliales de mama [Norris *et al.*, 1996, 1997; Kang *et al.*, 2009; Porro *et al.*, 2011]. Wang y colaboradores [Wang *et al.*, 2015] reportaron que los nanotubos de carbono podrían regular negativamente la expresión de MRP4 y P-gp en células de carcinoma de colon mediante la inhibición de c-Myc. Curiosamente, también se demostró que el AMPc por sí mismo puede estimular la expresión de MRP4 a través de una ruta mediada por proteínas de intercambio activadas por AMPc en células HeLa, células de músculo liso y células M07e de leucemia megacarioblástica [Bröderdorf *et al.*, 2014]. En forma consistente con lo anterior, se ha reportado que el AMPc intracelular regularía positivamente la expresión de MRP4 a través de proteínas de intercambio activadas por AMPcs, mientras que el AMPc extracelular regularía en forma positiva MRP4 principalmente a través de una vía mediada por MEK/ERK [Carozzo *et al.*, 2015]. Por lo tanto, se propone que el AMPc intracelular, para mantener su homeostasis celular, actuaría regulando positivamente la expresión de MRP4 a través de un mecanismo de retroalimentación negativa.

Hasta la actualidad se han identificado más de 400 SNPs no sinónimos [*dbSNP database*], de los cuales 63 han sido validados por el “1000 Genomes project” [Genomes Project Consortium, 2015], muchos de los cuales, validados por estudios *in vitro* demuestran tener una influencia sustancial en la capacidad de transporte de MRP4, pero su baja frecuencia dificulta la verificación de su significado clínico.

Por otro lado, los polimorfismos ubicados en la región del promotor o en el 3'UTR pueden afectar la capacidad de unión de factores transcripcionales y miRNA, que pueden estar implicados en la regulación transcripcional y postranscripcional del gen.

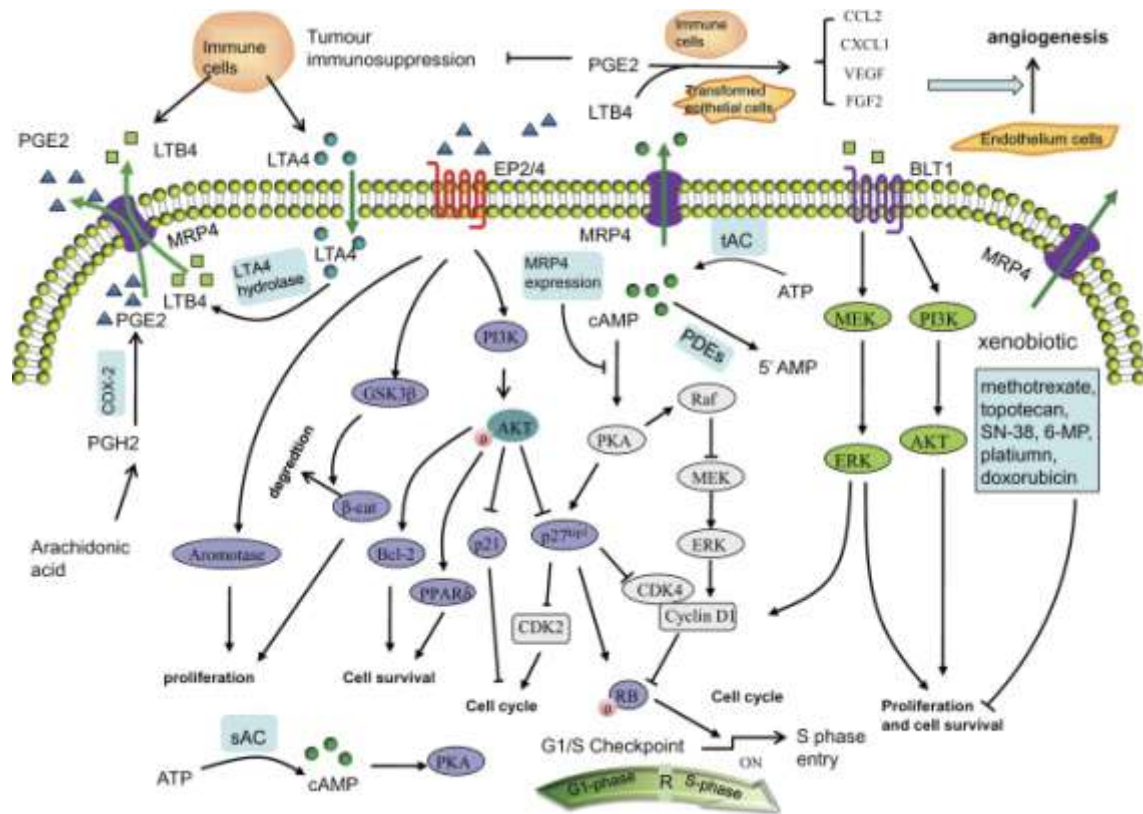


Figura I16. Vías relacionadas con MRP4 implicadas en la progresión y el pronóstico del cáncer. Tres principales vías de señalización celular pueden mediar los efectos de MRP4 en el pronóstico del cáncer y la resistencia a los medicamentos. **A)** La señalización mediada por PKA-cAMP inhibe las vías de Raf y ERK, lo que causa el arresto del ciclo celular en el punto de chequeo G1/S. De la misma manera PKA también inhibe la proliferación a través de la inducción del inhibidor P27kip1 quien suprime a CDK2 y CDK4. Sin embargo, la sobre-expresión de MRP4 decrece la señalización de PKA-cAMP y revierte el arresto del ciclo celular. **B)** En la célula cancerosa, MRP4 puede bombear hacia el medio extracelular PGE2 y LTB4 lo que contribuye a los efectos de la progresión del cáncer a través de vías autócrinas y parácrinas. Por otro lado, PGE2 puede conducir a la supresión inmune y a la disminución de la inmunidad antitumoral, mientras que, conjuntamente, PGE2 y LTB4 pueden promover la excreción de factores angiogénicos de las células inmunes y las células epiteliales transformadas. Más importante aún, PGE2 puede estimular la proliferación y la supervivencia celular a través de la unión a los receptores EP2/ 4, que activan la aromatasa, β -catenina (β -cat) y PI3K-AKT. La activación de PI3K-Akt por PGE2 puede inhibir adicionalmente p21 y p27kip1, que tienen un efecto inhibitor sobre el ciclo celular. **C)** MRP4 juega un papel canónico en el bombeo de xenobióticos, lo que conduce a la resistencia a los medicamentos. GSK, glycogen synthase kinase; FGF, fibroblast growth factor; MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; VEGF, vascular endothelial growth factor (tomado de Wen et al., 2015).

Uno de los primeros estudios enfocados en identificar los polimorfismos del gen *ABCC4* en humanos, llevado a cabo con ADN de individuos sanos de distinto origen étnico, arrojó como resultado la presencia de 98 variantes ubicados en la región codificante y regiones intrónicas flanqueantes, de las cuales 43 se ubican en la región codificante, siendo 22 de ellas no sinónimas [Abla *et al.*, 2008]. En el mismo estudio se seleccionaron algunas variantes para determinar el efecto de cada SNP a nivel funcional en la proteína resultante, obteniéndose los siguientes resultados:

- las variantes presentes con una frecuencia mayor al 5% en la población estudiada (n= 270) fueron Gly187Trp, Lys304Asn y Met744Val;
- las variantes con un mayor índice de Grantham (el cual indica cambios estructurales en la proteína respecto de la proteína de referencia o *wild type*) son Gly187Trp, Cys956Ser, Gly487Glu y Lys304Asn;
- la variante Gly187Trp producía un aumento en la acumulación intracelular de ANs (43% de AZT y 69% de Adefovir) con respecto a las células expresando la proteína MRP4 de referencia, mientras que se registró una menor expresión *in vitro* de dicha variante cuando se buscó expresarla en células HEK293T (solo a nivel proteico, no así a nivel de ARNm);
- la variante Cys956Ser produjo un leve disminución en la acumulación intracelular de Adefovir con respecto a las células expresando la proteína MRP4 de referencia (evidenciando una mayor actividad) aunque no se registró un aumento en su expresión [Abla *et al.*, 2008].

Anderson y colaboradores encontraron que en pacientes que presentaban un SNP en la región 3' UTR de *ABCC4* (rs3742106), infectados con HIV y tratados con Lamivudine, la acumulación intracelular de dicho antiviral era un 20% mayor que en aquellos pacientes que no presentaban dicho SNP (Anderson *et al.*, 2006). Con respecto a este polimorfismo, Chen y colaboradores demostraron recientemente que está significativamente asociado a la eficacia del tratamiento con 5-fluoruracilo/ capecitabina en pacientes con cáncer colorrectal, dado que la expresión del gen *ABCC4* está regulada a través de la unión del miRNA miR-3190-5p al sitio 3'UTR, el cual inhibe la expresión de dicho gen. La capacidad regulatoria de este miRNA se pierde cuando el gen presenta dicha variación, aumentando su expresión y alterando la sensibilidad de las células a la quimioterapia [Chen *et al.*, 2017].

En un estudio con pacientes crónicamente infectados con HBV, se ha reportado que el polimorfismo rs11568658 (Gly187Trp) debilitaría la respuesta al tratamiento con ANs como Entecavir y Telvibudine [Wang *et al.*, 2014].

Por otro lado, Janke y colaboradores llevaron a cabo un estudio funcional del impacto de 11 polimorfismos de *ABCC4* presentes en caucásicos y otros grupos étnicos (utilizando como modelo oocitos de *Xenopus laevis*), reportando que las variantes Tyr556Cys y Tre1142Met se expresan un 30-40% menos respecto del control *wild type*, pero la variante Tyr556Cys presenta mayor

capacidad de transportar Adefovir que la proteína *wild type* [Janke *et al.*, 2008]. Consistentemente con lo anterior, otro estudio demostró que las variantes Gly187Trp y Lys304Asn presentan una reducción en su actividad de transporte de metabolitos del arsénico (73% y 30% de actividad respectivamente, comparadas con la proteína *wild type*), mientras que la variante Tyr556Cys presenta un aumento del transporte de dichos metabolitos (184% respecto de la proteína *wild type*) [Banerjee *et al.*, 2016]. Existen otros estudios que reportan una asociación entre el polimorfismo rs2274407 (Lys304Asn) y, no solo la falla en la respuesta a la quimioterapia empleada en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda o un aumento en el riesgo de toxicidad [Tanaka *et al.*, 2015], sino también en el desarrollo de dicha patología, dado su rol en el transporte de AMPc y la señalización intercelular. Análisis *in silico* muestran que este polimorfismo no afectaría el transporte de sustratos dado que este aminoácido no está involucrado en ninguno de los pasos de transporte, pero la variación nucleotídica sería determinante induciendo un *splicing* aberrante en el que se excluye el exón 8 (dado que se localiza en el sitio aceptor de dicho exón), hipótesis que fue confirmada experimentalmente [Mesrian Tanha *et al.*, 2017].

Dado que varios estudios han demostrado una evidente correlación entre las concentraciones de fármaco en plasma y la eficacia o toxicidad en la terapia antiviral, se sugiere enfáticamente que los genotipos de los transportadores antirretrovirales, incluido MRP4, se tengan en cuenta en relación con la dosificación individual [Sánchez *et al.*, 2011]. Teniendo en cuenta esto, se decidió estudiar la presencia de algunos polimorfismos en pacientes crónicamente infectados con HBV y evaluar su respuesta a la terapéutica antiviral prescrita en el tratamiento de cada uno. Los polimorfismos a ser evaluados fueron seleccionados tomando en cuenta la frecuencia en la que aparecen en la población (es decir, se descartaron aquellos que según la bibliografía son muy poco frecuentes) y su potencial importancia clínica debido al efecto en el transporte de sustratos o en la expresión de la proteína y su localización en membrana. Los mismos se detallan en la tabla I2.

Tabla I2. Polimorfismos del gen *ABCC4* evaluados.

Polimorfismo	Sustitución nucleotídica	Exón	Cambio aminoacídico
rs11568658	559G>T	5	Gly187Trp
rs2274407	912G>C	8	Lys304Asn
rs753414892	1667A>G	13	Tyr556Cys
rs11568707	2867G>C	23	Cys956Ser
rs11568644	3425C>T	27	Thr1142Arg
rs3742106	*38T>G	31*	*

*corresponde a la región 3'UTR

iii. Proteína MRP5

La proteína MRP5 está codificada por el gen *ABCC5* y es más corta que MRP4. Esta proteína presenta varios dominios: dos dominios de membrana (MSD) y dos dominios de unión a nucleótidos (NBD) (figura I17).

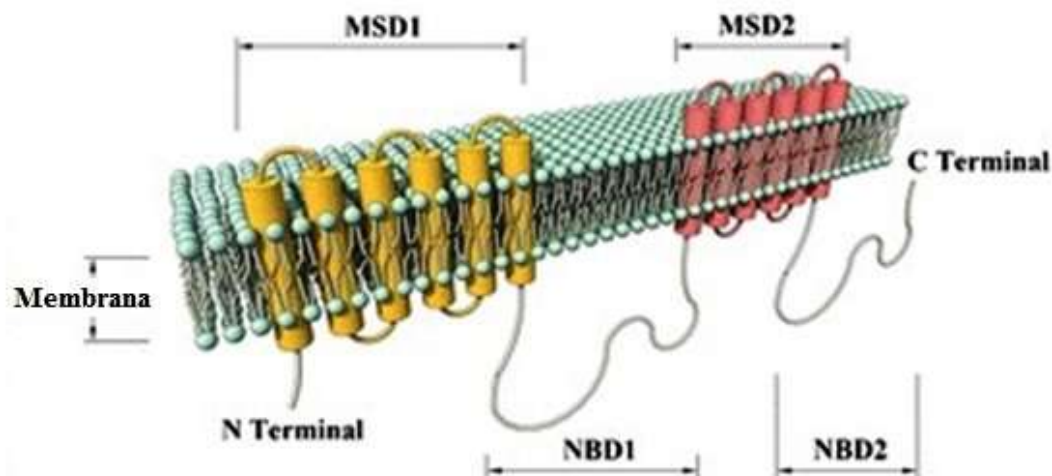


Figura I17: Esquema de la estructura predicha para la proteína MRP5. MSD: dominio de membrana. NBD: dominio de unión a nucleótidos [Zhang *et al.*, 2015].

La expresión de MRP5 fue detectada en una amplia variedad de tejidos humanos normales tales como hígado, placenta, músculo, cornea y cerebro; así como en tejidos tumorales. En el cerebro, MRP5 está presente en las células endoteliales de los capilares, neuronas y células de la glía. En la mayoría de las células este transportador se ubica en la membrana plasmática basolateral, pero en las células endoteliales de los capilares cerebrales que conforman la barrera hemato-encefálica dicha proteína reside en la membrana apical. En base a este hecho, MRP5 es considerada una parte importante de la barrera hemato-encefálica.

Esta proteína está implicada en el transporte de metabolitos endógenos como nucleótidos cíclicos (cAMP y GMP) y ácido fólico, entre otros. Diversos estudios *in vitro*, sugieren que MRP5 transporta diversas drogas anti-cancerosas como cisplatina, MTX, análogos de purina, y análogos de pirimidina, entre otros, motivo por el cual también está asociada al transporte de drogas antivirales [Wijnholds *et al.*, 2000; Adema *et al.*, 2014; Jansen *et al.*, 2015].

iv. Proteína MDR1

También conocida como P-gp y producto del gen *ABCB1*, fue el primer transportador ABC humano descubierto, clonado y caracterizado por su capacidad de conferir un fenotipo MDR en células tumorales [Juliano y Ling, 1976]. Además, estos transportadores juegan un rol importante en la farmacocinética de numerosas drogas, afectando su biodisponibilidad. Mediante el uso de la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP, MDR1 es capaz de bombear un amplio espectro de compuestos que incluyen los alcaloides de la vinca (vinblastina y vincristina), antraciclinas (doxorrubicina y daunorrubicina), taxanos (paclitaxel y docetaxel) [Szakacs *et al.*, 2006] y otros agentes citostáticos.

Se postula que MDR1 desempeña un rol importante en la eliminación de metabolitos tóxicos de las células. Se encuentra ampliamente distribuida en la mucosa intestinal, en la membrana luminal de las células del tracto gastrointestinal, en la membrana canalicular de los hepatocitos y en la barrera hemato-encefálica (BHE). MDR1 también se expresa en células tumorales que han desarrollado resistencia a diversos medicamentos [Robey *et al.*, 2018]. En pacientes con HCC, se ha informado que la sobre-expresión de MDR1 está asociada a una supervivencia más corta; curiosamente Ng y col. [Ng *et al.*, 2000], documentaron esta asociación solo en pacientes previamente tratados con quimioterapia. Está descrito que el alto nivel de expresión de MDR1 en los tumores se debe a la amplificación génica o a niveles elevados de transcripción génica [Robey *et al.*, 2018]. Se han descubierto numerosos inhibidores no específicos de MDR1 (verapamilo, tariquidar, disulfiram, entre otros), y a pesar de los resultados prometedores *in vitro*, usando varios modelos celulares de resistencia [Szakacs *et al.*, 2006], el éxito de la modulación de la MDR a través del bloqueo químico del transporte del fármaco de las células tumorales sigue siendo difícil de lograr.

v. Proteína MRP1

Fue el primer miembro de la subfamilia ABCC descubierto en 1992 [Cole *et al.*, 1992]; su posterior caracterización permitió elucidar que esta proteína representa una bomba alternativa para el transporte de drogas.

Se cree que esta proteína juega un rol tanto en la protección de las células frente a la toxicidad química y el estrés oxidativo, como así también participando en la respuesta inflamatoria debido a su rol activo en el transporte de leucotrienos, tales como el leucotrieno C4 (LTC4) [Cole y Deeley, 1998].

A pesar de las diferencias estructurales, existe un considerable solapamiento con otros transportadores ABC en el espectro de fármacos a los

que MRP1 confiere resistencia (como antihistamínicos, esteroides, antitumorales, inhibidores del HIV, entre otros). Sin embargo -a diferencia de MDR1- MRP1 requiere del glutatión celular para funcionar como bomba transportadora de fármacos [Cole y Deeley, 1998; Borst *et al.*, 2000]. Por ello es que los miembros de esta subfamilia de proteínas intervienen en el transporte de compuestos conjugados con glutatión.

MRP1 se expresa en forma ubicua en el organismo. Los tejidos con mayor expresión de este transportador se localizan en pulmón, testículos, riñón, corazón y placenta, mientras que una expresión reducida de éste se ha detectado en el intestino delgado, colon, cerebro y células mononucleares de sangre periférica [Gameiro *et al.*, 2017]. Además, MRP1 juega un papel muy importante en la disposición de drogas y xenobióticos en células normales y ayuda a proteger ciertos tejidos de injurias citotóxicas. En efecto, la distribución tisular de MRP1 es consistente con su rol de limitar la penetración de ciertos agentes citotóxicos a través de un gran número de barreras sangre-órgano. De esta manera, MRP1 contribuye a los llamados “sitios santuarios” del organismo, tales como la BHE y la barrera hemato-testicular [Gameiro *et al.*, 2017].

En enfermedades hepáticas graves y el HCC, la expresión de MRP1 se encuentra aumentada y se asocia a un fenotipo tumoral más agresivo [Ceballos *et al.*, 2018].

I. 3. CO-POLÍMEROS SEGMENTADOS DE PEO-PPO

Tanto la hepatitis crónica por HBV como el HCC constituyen enfermedades de alto impacto social y económico donde la farmacoterapia puede ser abordada y mejorada de manera notable utilizando diversas estrategias nanotecnológicas.

Una de las estrategias que se están evaluando en la actualidad para mejorar la eficacia de la terapéutica antiviral y antitumoral –además de disminuir los efectos adversos y mejorar la biodisponibilidad de los fármacos– es la formulación de fármacos donde el compuesto activo esté acompañado de co-polímeros segmentados de poli(óxido de etileno) –PEO- y poli(óxido de propileno) –PPO-; ya sea en forma de unímeros o como micelas poliméricas.

Un co-polímero, por definición, es un polímero compuesto por diferentes monómeros unidos entre sí por varios tipos de enlaces químicos.

Diferentes tipos de co-polímeros, tanto de origen natural como sintético, han sido identificados, evaluados y utilizados a fin de aprovechar sus novedosas propiedades fisico-químicas para su aplicación en diferentes campos.

Los co-polímeros son preparados no sólo a través de la polimerización de una variedad de combinaciones de monómeros con diferentes propiedades, sino también mediante la unión de bloques de diferentes longitudes de unidades estructurales repetidas, generando estructuras con propiedades diferentes y

únicas (Letchford y Burt, 2007). La combinación de diferentes unidades químicas en estructuras co-poliméricas resulta en nuevos materiales con nuevas y variadas propiedades. Por lo tanto, los co-polímeros pueden ser utilizados en la preparación de diferentes nanoestructuras con una amplia variedad de características. La posibilidad de sintetizar un segmento hace que sea factible cambiar sus propiedades mediante el control del peso molecular y la adición o eliminación de grupos químicos funcionales, formando estructuras con las funciones específicas deseadas.

Algunos de estos co-polímeros ya cuentan con la aprobación de la FDA para ser utilizados en la formulación y administración de fármacos y en dispositivos biomédicos, debido a sus propiedades de solubilización, la presencia de una alta gama de composiciones con diferentes proporciones PEO/PPO, la disponibilidad comercial, la alta biocompatibilidad, los bajos efectos secundarios *in vivo* y la capacidad para formar nanovehículos. Estos co-polímeros son considerados por la FDA como “*Generally recognized as safe*” (GRAS). Esta designación de “Generalmente reconocido como seguro” es empleada por la FDA para todo aquel producto químico o sustancia que se añade a los alimentos y/o medicamentos y es considerado seguro por expertos.

En particular, los poloxámeros y las poloxaminas, también conocidos comercialmente bajo el nombre de Pluronic® y Tetronic® respectivamente, son una familia de más de 50 diferentes macromoléculas anfifílicas.

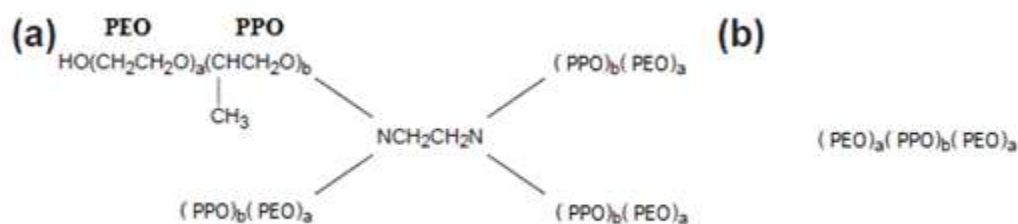


Figura I18. Estructura general de a) poloxaminas y b) poloxámeros

a. Poloxaminas

Las poloxaminas, o *Tetronics*, son tri-bloques iónicos tetrafuncionales formados por cuatro bloques PEOa-PPOb unidos entre sí por un grupo central etilendiamina con dos aminas terciarias que, a diferencia de los poloxámeros, las dotan de sensibilidad dual al pH [Álvarez-Lorenzo *et al.*, 2007] (figura I18). Se ha documentado que estos polímeros interactúan con la membrana plasmática e incluso se pudo determinar que según el grado de hidrofiliicidad de los mismos estos pueden ejercer un efecto protector evitando la lisis celular [Sandez-Macho *et al.*, 2015].

b. Poloxámeros

Los co-polímeros son macromoléculas anfifílicas pueden presentar actividad biológica por sí mismas. Ejemplo de ello es una clase de copolímeros: los *Pluronic*s o poloxámeros, los cuales son ampliamente utilizados en diversos sistemas de direccionamiento de drogas [Alakhov *et al.*, 1996; Alakhova *et al.*, 2013; Batrakova y Kabanov, 2008; Guan *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2013; Zaki, 2014; Hong *et al.*, 2013] así como en ingeniería de tejidos [Frisman *et al.*, 2011, 2012; Cha *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011]. Los *Pluronic*s son co-polímeros de tres bloques de polióxido de etileno (PEO) y polióxido de propileno (PPO), en un arreglo del tipo PEO-PPO-PEO (figura I18). El balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de los copolímeros varía de acuerdo a la longitud de los bloques.

Por encima de su concentración micelar crítica (CMC), los *Pluronic*s en solución forman micelas espontáneamente. El núcleo de las micelas está formado por bloques de PPO y permite la incorporación de drogas hidrofóbicas.

Previamente calificados como inertes, los *Pluronic*s presentan un conjunto único de actividades biológicas y han demostrado ser potentes sensibilizadores de células tumorales MDR tanto *in vitro* como *in vivo* [Alakhov *et al.*, 1996; Batrakova y Kabanov, 2008; Alakhov *et al.*, 1999; Alakhova *et al.*, 2010; Batrakova *et al.*, 2001].

c. Aplicaciones biomédicas y biofarmacéuticas de los co-polímeros de PEO-PPO

Desde su primera introducción como surfactantes en la década de 1950, se ha encontrado una amplia gama de aplicaciones de los co-polímeros en los campos farmacéutico y biomédico [Rey-Rico *et al.*, 2018], en particular, en el diseño y desarrollo de nuevos sistemas de liberación de drogas (*Drug Delivery Systems*).

Los poloxámeros y las poloxaminas, constituyen una alternativa atractiva para optimizar aspectos tecnológicos de fármacos y superar un amplio espectro de desventajas (bio)farmacéuticas. Los co-polímeros, en función de su estructura química, tienen la capacidad de disolver, atrapar, adsorber, unir o

encapsular agentes terapéuticos a fin de lograr la liberación controlada de fármacos. En este contexto, estos surfactantes pueden ser considerados como soluciones ideales para la administración de diversos agentes, especialmente fármacos con baja solubilidad en agua y/o que sufren de una biodisponibilidad o estabilidad limitada en los compartimentos biológicos. Por ejemplo, más del 50% de las drogas son hidrofóbicas, y por su baja solubilidad en medios biológicos aparecen problemas de absorción en el tracto digestivo presentando así una limitada biodisponibilidad. Adicionalmente, muchos de estos fármacos son inestables en las condiciones de pH propias del medio gastrointestinal.

Debido a ello, una de las estrategias nanotecnológicas más prometedoras es la encapsulación de drogas hidrofóbicas en diversos nanovehículos, entre ellos, micelas poliméricas que son estructuras formadas por la agregación de moléculas poliméricas anfifílicas. Los co-polímeros segmentados de PEO-PPO son los biomateriales termo-sensibles formadores de micelas más extensamente estudiados [Rey-Rico *et al.*, 2018]. Además, algunos miembros de esta clase de polímeros actúan como excipientes en la elaboración de adyuvantes para vacunas [McIlroy *et al.*, 2009; Wilson-Welder *et al.*, 2009] y como inhibidores de las proteínas ABC [Kabanov *et al.*, 2002]. También resultan adecuados para otras aplicaciones biomédicas, tales como la administración de fármacos, terapia génica e ingeniería de tejidos [Rey-Rico *et al.*, 2018].

Actualmente, uno de los desafíos de la terapia contra el HBV y el HCC es revertir la resistencia celular al tratamiento debida a la sobre-expresión de algunos miembros de la superfamilia de transportadores ABC. Según algunos estudios, estos surfactantes poliméricos en forma de unímeros actuarían inhibiendo la actividad de algunas de las bombas ABC, procurando lograr la concentración intracelular adecuada de droga para que la misma sea eficaz [Kabanov *et al.*, 2002; Alakhova *et al.*, 2010; Cuestas *et al.*, 2011].

Existe muy poca información sobre la actividad inhibitoria de las bombas ABC por parte de poloxaminas y poloxámeros, aunque se observó que la interacción del Pluronic® P85 con la membrana celular produce una inhibición significativa de la actividad ATPasa de MDR1 [Batrakova *et al.*, 2001; Batrakova *et al.*, 2003]. Un análisis de la bibliografía disponible permite observar que el co-polímero más estudiado en lo que refiere a su interacción con los transportadores ABC es el poloxámero P85. Se ha demostrado su capacidad de prevenir el desarrollo de MDR en las células cancerosas expuestas a un fármaco antitumoral [Batrakova *et al.*, 2006]. Pluronic P85 es capaz de "re-sensibilizar" células que ya han desarrollado un fenotipo resistente, revirtiendo al estado observado en las células parentales, lo que sugiere que en presencia del co-polímero estas células no tienen ninguna ventaja selectiva para su crecimiento. Estudios posteriores demostraron que el *Pluronic* P85 impedía el desarrollo del fenotipo MDR1 (es decir, la sobre-expresión de dicho transportador) en células de leucemia *in vitro* e *in vivo* [Sharma *et al.*, 2008]. Además de lo documentado para *MDR1*, el tratamiento con P85 revirtió alteraciones en la expresión de genes

implicados en la apoptosis, el metabolismo de fármacos, la respuesta al estrés, el transporte de sustancias a través de membrana y la tumorigénesis. Esto refuerza aún más los beneficios potenciales del uso de tales formulaciones para la quimioterapia de tumores.

También se han descrito otros mecanismos por los cuales los poloxámeros revertirían la MDR: **(i)** la incorporación de moléculas de co-polímero en las membranas y la disminución de la microviscosidad de la membrana plasmática, **(ii)** la depleción del ATP, **(iii)** la inhibición de transportadores ABC, **(iv)** la inhibición del sistema de detoxificación GSH/GST (cuyos niveles de expresión están asociados con los niveles de expresión de MRP1) y **(v)** la liberación de drogas desde vesículas ácidas en el interior de células con fenotipo MDR [Batrakova y Kabanov, 2008]. Sorprendentemente, estos efectos fueron más evidentes para concentraciones de polímero por debajo de la concentración micelar crítica (CMC) [Batrakova *et al.*, 1999, Miller *et al.*, 1999], sugiriendo que los unímeros, es decir las moléculas individuales de co-polímero, son responsables de la modificación de propiedades biológicas. Se sugirió que el papel crucial de los unímeros (pero no de las micelas) está determinado por su capacidad para incorporarse en las membranas celulares y translocarse a través de ellas [Batrakova *et al.*, 2001a; 2001b].

Existen evidencias que demuestran que la acumulación intracelular de doxorubicina y otros sustratos de MDR1 en células resistentes que sobre-expresan este transportador, puede ser aumentada mediante el tratamiento con Pluronic® P85 o L61 [Alakhov *et al.*, 1996; Venne *et al.*, 1996]. Otros investigadores observaron que la máxima inhibición de la actividad funcional de MDR1 se obtiene con aquellos co-polímeros de PEO-PPO que presenten valores de BHL moderados o bajos, y un número de unidades de PPO entre 30 y 50 [Álvarez-Lorenzo *et al.*, 2010]. Es por eso que en el presente trabajo se evaluaron las poloxaminas Tetronic® T304, T904, T1107 y T1301 y el poloxámero Pluronic® F127 (P407). Las características principales de los mismos se resumen en la tabla I3.

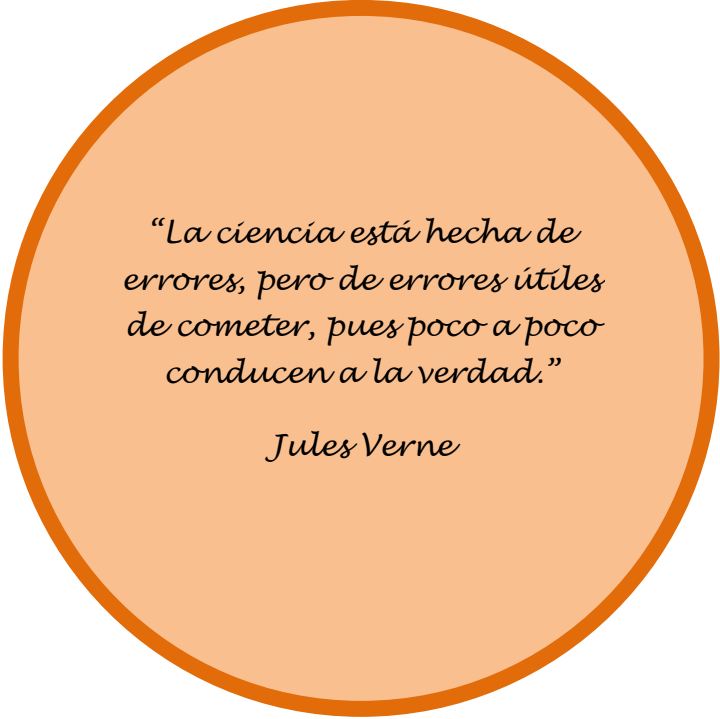
Tabla I3. Principales características de los co-polímeros de PEO-PPO utilizados

Co-polímero	PM (KDa)	PO	BHL
T304	1,65	16	12-18
T904	6,7	68	12-18
T1107	15	80	18-23
T1301	6,8	104	1-7
F127	12,6	65	18-23

PM: peso molecular; PO: unidades de óxido de propileno; BHL: balance hidrofílico-lipofílico

Se ha demostrado en modelos *in vitro* que una supresión selectiva de la producción de energía junto con la fluidización de la membrana producidos mediante el tratamiento con poloxámeros es capaz de generar la inhibición de bombas ABC y sensibilizar las células cancerosas MDR a la acción de los fármacos quimioterapéuticos [Batrakova *et al.*, 2001b]. Además, se demostró *in vivo* la potenciación de la acumulación de fármaco en tumores MDR en presencia del *Pluronic* P85 [Fukumoto, 2004; Mele *et al.*, 2007]. Por otro lado, se ha reportado que la inhibición de transportadores ABC mediante *Pluronic*s mejoró el transporte de una amplia gama de agentes terapéuticos a través de células endoteliales cerebrales y células intestinales *in vitro* [Batrakova *et al.*, 1999] e *in vivo* [Batrakova *et al.*, 2001c], respectivamente.

OBJETIVOS



“La ciencia está hecha de errores, pero de errores útiles de cometer, pues poco a poco conducen a la verdad.”

Jules Verne

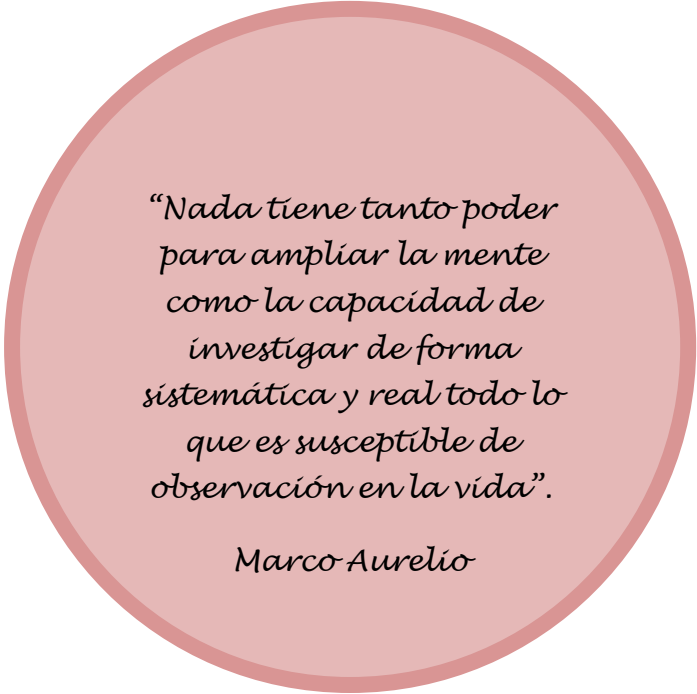
OBJETIVOS GENERALES

Los objetivos generales de este trabajo están dirigidos a contribuir al conocimiento de las bases moleculares de la resistencia a la terapéutica antiviral utilizada en el tratamiento de la hepatitis B crónica y al desarrollo de estrategias tendientes a optimizar dicha terapéutica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Estudiar la regulación de la expresión de transportadores de la familia ABC implicados en el transporte de drogas antivirales por parte de:
 - i. La replicación del HBV.
 - ii. La proteína X del HBV (proteína *wt* y con las mutaciones I127T/K130M/V131I).
- B. Desarrollar estrategias tendientes a optimizar la terapéutica anti-HBV mediante el diseño de formulaciones AN - co-polímero que permitan que se alcance la concentración de droga intracelular efectiva, a la vez de disminuir la exposición sistémica al compuesto antiviral.
- C. Analizar el perfil de resistencia a drogas antivirales en pacientes crónicamente infectados con HBV.
 - i. Estudiar mutaciones en el dominio TI del gen Pol del HBV asociadas a la resistencia a drogas antivirales.
 - ii. Estudiar polimorfismos en el gen *ABCC4/MRP4* asociados a trastornos en la actividad funcional de dicha bomba.

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS



*“Nada tiene tanto poder
para ampliar la mente
como la capacidad de
investigar de forma
sistemática y real todo lo
que es susceptible de
observación en la vida”.*

Marco Aurelio

• **PACIENTES**

Se estudiaron 15 muestras de sangre periférica de pacientes adultos crónicamente infectados con HBV que concurren al Servicio de Hepatología del Hospital Dr. Cosme Argerich de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, entre los años 2011-2015.

Se obtuvo una muestra de 10 ml de sangre entera anticoagulada con 125 µl de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10%. Se centrifugó a 1900 rpm durante 10 minutos, se recuperó el plasma y se lo conservó en tubo eppendorf debidamente rotulado con el código de origen asignado para cada participante. El presente proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Dr. Cosme Argerich, así como por el Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (EXP-FYB: 734402/10).

• **MATERIALES**

MM 1. LÍNEAS CELULARES

a. Cultivo y mantenimiento

• **HuH-7 (JCRB0403)**

Línea celular hepatocitaria inmortalizada, derivada de carcinoma hepatocelular. Generada a partir de una biopsia de un carcinoma hepatocelular bien diferenciado de un hombre japonés de 57 años. Esta línea fue establecida por Nakabayashi, H. y Sato, J. en 1982 [Nakabayashi *et al*, 1982].

Cultivo: Células crecidas en medio mínimo esencial Dulbecco (DMEM; *Life Technologies*, EE.UU.) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB; Sigma) inactivado (56°C durante 30 min).

• **HepG2 (ATCC HB-8065)**

Línea celular hepatocitaria inmortalizada, derivada de carcinoma hepatocelular. Generada a partir de una biopsia de un carcinoma hepatocelular de un joven caucásico de 15 años. Esta línea fue establecida por Knowles, B. en 1980 [Knowles *et al*, 1980].

Cultivo: Células crecidas en DMEM suplementado con 10% de SFB.

• **HepG2/C3A (ATCC CRL-10741)**

Línea celular derivada de un clon de células HepG2, seleccionado por presentar inhibición por contacto.

Cultivo: Células crecidas en DMEM suplementado con 10% de SFB.

- **HepG2.2.15**

Línea celular obtenida a través de la transfección estable de células HepG2 con el genoma del virus HBV (subgenotipo D3) clonado en un plásmido. Se utiliza como modelo *in vitro* para estudios en HBV, ya que el virus puede replicar activamente en esta línea celular [Sureau *et al*, 1986]. El genoma del virus se encuentra integrado al genoma de la célula.

Cultivo: Células crecidas en DMEM suplementado con 10% de SFB y 200 µg/ml de Geneticina (G418, Gibco, EE.UU.).

Todas las líneas celulares fueron crecidas y mantenidas en estufa a 37°C con 5% de CO₂. Durante los pasajes, las células fueron lavadas con PBS y tratadas con reactivo comercial para disociación celular *TrypLE™ Express* (Life Technologies, EE.UU.).

- b. Criopreservación**

Las células HepG2, HepG2/C3A y HuH7 fueron congeladas en DMEM con 20% SFB y 8-10% de dimetilsulfóxido (DMSO; *Sigma*), en alícuotas de 1,2 ml con una densidad celular de entre 2 x10⁶ y 4 x10⁶ células/ml.

Las células HepG2.2.15 fueron congeladas en DMEM con 40% SFB y 8-10%DMSO; densidad celular 1 x10⁷ células/ml.

- c. Control de contaminación con micoplasmas**

Las líneas celulares empleadas fueron examinadas en cuanto a la presencia de contaminación con micoplasmas mediante una reacción de PCR optimizada para dicho fin. Con este procedimiento se amplifica un fragmento complementario a la región 16sRNA del genoma de microorganismos de las especies *Mycoplasma* (*M. hiorhinis*, *M. arginini*, *M. orale*, *M. fermentans*, *M. pirum*). Esta reacción no amplifica DNA eucariota, ni procariotas clásicos. Resulta en un fragmento de 280 pares de bases.

Para ello se deja crecer un cultivo de las células a examinar durante 8-10 días, y se extrae ADN total de una alícuota de sobrenadante del cultivo, mediante columna según las especificaciones del fabricante, detalladas en la sección MM5.b.i (*Inbio Highway, Tandil, Buenos Aires*). Se utilizan controles positivo y negativo de extracción.

Reacción de PCR:

Reactivo	Volumen (μl)/tubo de reacción
Agua	14,275
Buffer 10X	2,500
MgCl ₂	0,600
dNTPs 10 mM	0,500
Primer F (100 ng/μl)	1,000
Primer R (100 ng/μl)	1,000
Taq Pol (5U/μl)	0,125
ADN	5,000
CICLADO	
94°C – 1 min	
94°C – 1 min	35 ciclos
55°C – 1 min	
72°C – 2 min	
72°C – 2 min	

Secuencias de oligonucleótidos (*primers*):

F (sentido): 5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'

R (antisentido): 5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3'

Se sembraron los productos de amplificación en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0,5 μg/ml). Se realizó la corrida electroforética a 100 V durante 30 min.

MM 2. COMPUESTOS

a. Copolímeros segmentados de PEO-PPO

Con el fin de optimizar la eficacia de la terapéutica antiviral, se utilizaron dos grupos de copolímeros que podrían luego ser combinados con los análogos de nucleósidos a evaluar: copolímeros segmentados de PEO/PPO lineales (poloxámeros) y ramificados (poloxaminas) (*BASF Corporation*, EE.UU.). Se evaluaron las poloxaminas Tetronic® T304, T904, T1107 y T1301 y el poloxámero Pluronic® F127. Las características principales de los mismos se resumen en la tabla I3.

Para eliminar residuos propios de la síntesis que podrían resultar citotóxicos, los compuestos fueron dializados en agua destilada utilizando una membrana de celulosa (MWCO = 1000-3500, Spectra/Por Dialysis Membrane, *Spectrum Laboratories Inc.*, EE.UU.) con recambios de agua a 1 h, 2 h, y luego cada 12 h durante 3 días. Las soluciones fueron alicuotadas y congeladas a -80°C, luego de lo cual fueron liofilizadas.

Las soluciones madre se prepararon a partir de los compuestos ya dializados y liofilizados, utilizando agua Milli-Q, con disolución de los compuestos a 4°C, y fueron esterilizadas por filtrado (filtro de 0,22 µm, *Millipore Ireland B.V.*, Carrigtwohill, Co. Cork, Irlanda). A partir de las mismas se prepararon diluciones de trabajo al 1; 0,1 y 0,01% (p/v) en DMEM con 10% de SFB. Las soluciones fueron estabilizadas durante al menos 1 h a temperatura ambiente antes de ser utilizadas.

b. Análogos de nucleósidos

Los análogos de nucleósidos fueron obtenidos por síntesis química a partir del 2-amino-1-indanol sobre cuya estructura se construyó un anillo de purina, dos de azapurina y un triazol a partir del grupo amino: de esta forma se obtuvieron cuatro compuestos: los compuestos **1** y **2** son derivados de azapurina, el **3** del triazol y el **4** de purina (figura MM1). Los mismos fueron sintetizados por el grupo dirigido por la Dra. Albertina Moglioni (Cátedra de Química Medicinal, FFyB, UBA).

Estos compuestos fueron diluidos en DMSO hasta una concentración 200 mM (solución madre). Las soluciones de trabajo fueron preparadas a partir de dicha solución madre en DMEM con 10% SFB.

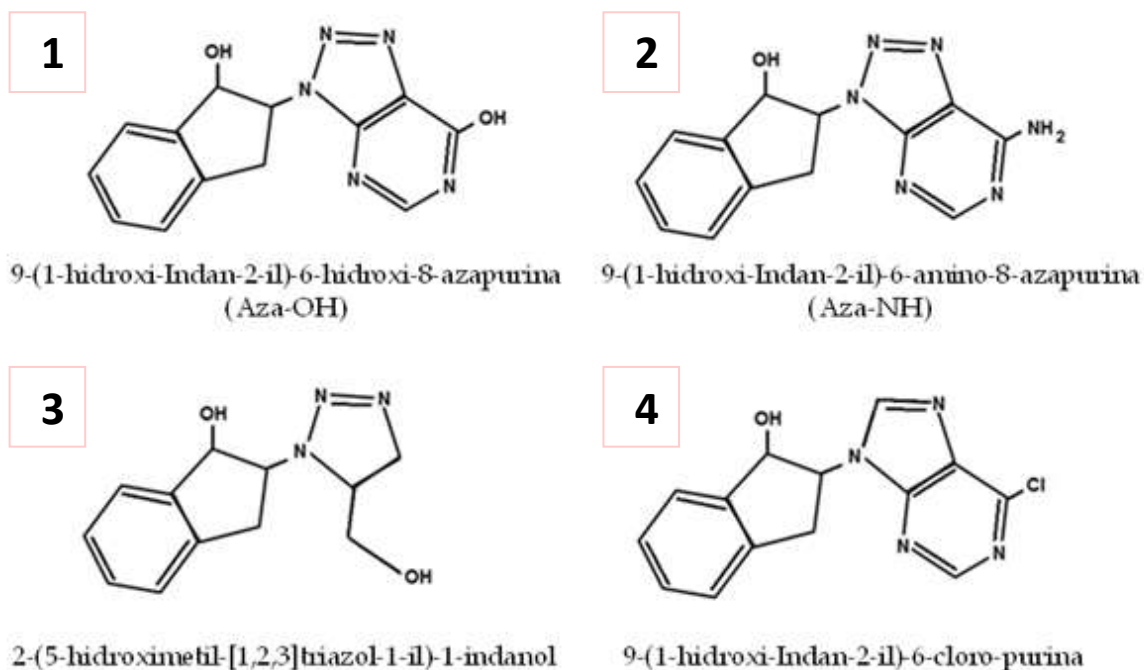


Figura MM1. Análogos nucleosídicos utilizados en el ensayo de actividad antiviral

• **METODOLOGÍA**

MM 3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL HBV SOBRE LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES ABC

a. Efecto de la replicación del HBV sobre la expresión de transportadores ABC

Para evaluar el efecto de la replicación del HBV sobre la expresión de transportadores de la familia ABC, se utilizaron las células HepG2.2.15 como modelo *in vitro* de replicación, contrastando estos resultados con la línea celular de la que derivan, HepG2, utilizando a estas últimas como control negativo de replicación viral. Para ello se tomaron muestras de cultivos confluentes de ambas líneas celulares (cosechadas mediante la utilización del reactivo de disociación celular TrypLE Express, *Life Technologies*) provenientes de botellas T25: la mitad de las células se utilizó para extracción de ARN, y la mitad restante para obtención de extractos proteicos. Para esto, el día anterior a la cosecha se sembraron $1,25 \times 10^6$ células HepG2 y $1,8 \times 10^6$ células HepG2.2.15 en cada botella T25.

i. Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de transportadores ABC mediante PCR en tiempo real

1. Extracción de ARN a partir de cultivos celulares

Con el objetivo de evaluar el efecto de la replicación del HBV sobre la cantidad relativa de ARNm de distintos genes ABC, se realizó la extracción de ARN de cultivos de células HepG2.2.15, así como de cultivos de células HepG2, utilizando el reactivo comercial TRIzol®LS Reagent (*Life Technologies*, EE.UU.).

Una vez cosechadas y lavadas las células (con PBS), se adicionaron 500 μ l de TRIzol, se homogeneizó la mezcla y se dejó reposar durante 2 min a temperatura ambiente. Se agregaron 200 μ l de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Luego de dejar reposar nuevamente por 2 min, se centrifugaron las muestras durante 15 min a $12000 \times g$ a 4°C . Se separó la fase acuosa y se agregó 1 μ l de glicógeno como co-precipitante, 500 μ l de isopropanol y se centrifugó a 4°C a $12000 \times g$ durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó el exceso de sales del *pellet* mediante el agregado de 1000 μ l de etanol 75%. Se centrifugó durante 5 min a $7500 \times g$ en frío y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar el *pellet* a 37°C hasta que el mismo se observó transparente (durante 5-10 min), luego de lo cual fue resuspendido en 20 μ l de agua estéril libre de ARNasas. El ARN fue almacenado a -80°C hasta su posterior utilización.

2. Síntesis de ADNc

Una vez extraído el ARN se hicieron diluciones en agua destilada y se evaluó el grado de pureza del mismo mediante la medición de absorbancias a 260 y 280 nm y la determinación de la relación A260/A280, utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (*Thermo Scientific Inc.*, EE.UU.). Se consideró que el nivel de pureza era adecuado cuando dicha relación arrojó un valor comprendido entre 1,8 y 2. Posteriormente, se cuantificaron los niveles de ARN según el valor de la absorbancia a 260 nm. Se calculó la concentración [ng ARN/ μ l] de acuerdo a la relación 1 DO = 40 ng/ μ l, para DO comprendidas entre 0,4 y 0,8.

Luego de la cuantificación del ARN, se tomó el volumen equivalente a 1 μ g de ARN de cada muestra para la reacción de transcripción inversa (síntesis de ADNc). Para ello, se utilizaron hexámeros de nucleótidos aleatorios (*random primers*, dN₆), siguiendo el protocolo descripto a continuación.

Reactivo	Volumen (μ l)/tubo de reacción
dN ₆ (100 ng/ μ l)	2
dNTPs (10 mM)	1
ARN	Volumen equivalente a 1 μ g (llevados a 10 μ l)
65°C 5 min	
Hielo	
<i>Buffer</i> 5X	4
DTT	2
37°C 10 min	
MMLV (<i>Life Technologies</i>)	1
25°C 10 min	
37°C 60 min	
95°C 45 min	

3. Medición del ARNm de genes ABC mediante PCR en tiempo real

Se midió el nivel de ARNm de los transportadores BCRP, MRP4 y MRP5 en células HepG2.2.15 (modelo *in vitro* de replicación del HBV) respecto de células HepG2 (donde no hay replicación viral), por PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR). Los ensayos de qPCR que se describirán a continuación fueron realizados utilizando Rotor-GeneTM6000 (*Corbett*) y como reactivo Mezcla Real (*Biodynamics*, Buenos Aires, Argentina) la que contiene el colorante fluorescente EvaGreen®.

Previo a la cuantificación relativa de los ARNm estudiados se realizaron curvas de calibración para cada uno de los pares de *primers* empleados. De esta forma se verificó que la eficiencia de las reacciones fuese cercana a 1 y que las

mismas se correspondieran con la eficiencia de la reacción de amplificación del gen 18s, el cual se utilizó para relativizar todos los resultados.

Reactivo	Volumen (μl)/tubo de reacción
Mezcla real (2X)	12,5
Primer F (10 μM)	0,5
Primer R (10 μM)	0,5
Agua	10,5
ADNc (dilución 1:10)*	1,0

Ciclado:

Desnaturalización: 95°C - 3 minutos

Ciclado: 95°C - 20 segundos
60°C - 1 minuto } x 40 ciclos

Melting: desde 70°C hasta 95°C aumentando 0,2°C cada vez.

Gain: 6

Se realizaron tres ensayos para cada gen dentro de los cuales cada muestra fue a su vez evaluada por triplicado.

El análisis de los resultados fue llevado a cabo en todos los casos utilizando el método $\Delta\Delta CT$ incluido en el programa *Rotor-Gene6000 Series Software 1.7*.

Los gráficos de las amplificaciones obtenidas fueron expresados como cantidades relativas (QR), calculadas con los valores de CT analizados con el *software* anteriormente mencionado, donde CT es una medida del *software* para cada muestra y corresponde al ciclo en el cual la fluorescencia alcanza un umbral arbitrario en la parte lineal de la curva de la reacción. Los valores de CT fueron normalizados usando la amplificación del gen *housekeeping* 18s como control interno. A partir de los datos numéricos obtenidos con el *software* se llevó a cabo una cuantificación de los mismos con el fin de traducirlos a porcentajes. Los cálculos correspondientes son:

CT: número de ciclos para el umbral de fluorescencia seleccionado.

ΔCT : diferencia entre el promedio de los valores de CT de las muestras utilizando oligonucleótidos de los genes incógnita y los valores de CT de las muestras utilizando oligonucleótidos para el gen *housekeeping* 18s.

$$\Delta CT = CT_{ABC} - CT_{18s}$$

$\Delta\Delta CT$: diferencia entre el ΔCT en la condición control (HepG2) y el ΔCT en la condición tratada/ replicación viral (HepG2.2.15).

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{células control}) - \Delta CT (\text{células tratadas})$$

* Para las curvas de calibración se ensayaron diluciones 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40, resultando la dilución 1:10 óptima para las medición de variaciones.

QR (cantidad relativa): $2^{\Delta\Delta CT}$.

Si $QR=1$, no hay diferencia entre el control y las células tratadas; $QR > 1$ indica el número de veces que aumenta la expresión del gen; y $QR < 1$ representa el número de veces que dicha expresión se encuentra inhibida respecto de la condición control.

Tabla MM1. Oligonucleótidos empleados para las reacciones de PCR en tiempo real

Nombre	Secuencia
MRP4 – F	AAAATGTCAATCATACCTCAGGAACC
MRP4 – R	ACCTCTTGTAAGGCATTCCACAG
MRP5 – F	CCCAGGCAACAGAGTCTAACC
MRP5 – R	CGGTAATTCAATGCCCAAGTC
BCRP – F	TATAGCTCAGATCATTGTCACAGTC
BCRP – R	GTTGGTCGTCAGGAAGAAGAG
18S- F	TAACCCGTTGAACCCCAT
18S - R	CCATCCAATCGGTAGTAGCG

F: forward (sentido), R: reverse (anti-sentido)

ii. Cuantificación relativa de los niveles de proteína de transportadores ABC mediante *Western blot*

1. Obtención de extractos proteicos totales a partir de cultivos celulares y cuantificación de la concentración proteica

Una vez cosechadas las células por tripsinización, y luego de dos lavados con PBS, se lisaron los *pellets* celulares obtenidos utilizando una solución de lisis (Tris 10 mM, NaCl 130 mM, EDTA 5 mM y Tritón X-100 1 %) con diferentes inhibidores de proteasas tales como PMSF 0,05 mM, leupeptina 0,05mM y AEBSF 0,5 mM (*Calbiochem*). Se incubó a 4° C durante 30 min y luego se centrifugó en frío a 20000 x g durante 15 min. Se recolectó el sobrenadante donde se encontraban las proteínas totales.

Dichos extractos proteicos fueron cuantificados mediante ensayo de Bradford. Se realizaron diluciones de albúmina de suero bovino (BSA) a concentraciones conocidas (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1 µg/µl) y diluciones 1/10 de los extractos proteicos totales, en agua destilada. Sobre una placa para ELISA se sembraron 4 µl de cada dilución de BSA y de cada dilución de los extractos proteicos, por duplicado. Como blanco de la reacción, se sembraron 4 µl de agua destilada. Se agregaron 200 µl del reactivo de Bradford (*BioRad*) y luego de 5 min se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector para ELISA. Se tomó el promedio de las absorbancias obtenidas y se graficó la curva patrón (Absorbancia en función de la concentración de BSA). De acuerdo a la ecuación de la recta obtenida, se calcularon las concentraciones proteicas de los extractos, en µg/µl, luego de multiplicar por el factor de dilución de las

muestras. Este ensayo se realizó por duplicado y se tomó la concentración media obtenida para cada extracto proteico.

2. Fraccionamiento electroforético de las proteínas en SDS-PAGE

La corrida electroforética se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Según la proteína de interés a cuantificar, se utilizaron los siguientes porcentajes de poliacrilamida en el gel:

MRP4: 8% poliacrilamida

BCRP: 12% poliacrilamida

Se sembraron 50 µg de proteínas totales para cada muestra en la cual se cuantificó BCRP y 100 µg para cuantificar MRP4, junto a 4 µl de un marcador de peso molecular (*BioRad*).

3. Western blot

Luego de la corrida electroforética, se procedió a la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (para cuantificación de BCRP, MDR1 y MRP1) o nitrocelulosa (MRP4). Dicha membrana fue coloreada posteriormente con rojo Ponceau para verificar la eficiencia del proceso.

Una vez que las proteínas fueron transferidas se realizó el bloqueo de la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente, con leche descremada en polvo al 5 % diluida en *buffer* TBS-T (Tris-Tween 0,05 %).

Posteriormente, se lavó la membrana con TBS-T durante 10 min y se procedió a la inmunodetección con el anticuerpo monoclonal específico correspondiente (tabla MM2) y se incubó O.N. a 4° C en agitación.

Al día siguiente, se efectuaron tres lavados durante 5 min con TBS-T y luego se incubó (a temperatura ambiente, durante 2-4 h con agitación) con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa.

Se realizó el mismo esquema de lavados que el posterior a la incubación con anticuerpos primarios y las membranas se incubaron durante 5 min con el reactivo quimioluminiscente *ECL Plus* (*Amersham*).

El revelado se realizó sobre placas radiográficas (*AGFA*), las cuales fueron posteriormente digitalizadas, lo que permitió la cuantificación de las bandas en píxeles mediante el programa “*Image-J*”.

Los niveles de proteínas fueron normalizados con respecto al nivel de expresión de β -Actina para BCRP, MDR1 y MRP1, y con GAPDH para MRP4, dado que al sembrar más proteína total (100 µg) para detectar MRP4 en estas células, no fue posible utilizar β -Actina para relativizar porque la abundancia de la misma imposibilitaba captar la fluorescencia sin “saturar” la placa radiográfica, pese a que se redujo el tiempo de exposición de la misma a la membrana todo lo posible. Es por este motivo que se utilizó para relativizar otra

proteína de expresión constitutiva, pero que permitiera realizar una cuantificación relativa de MRP4, como GAPDH.

Tabla MM2. Anticuerpos utilizados para la detección de transportadores ABC mediante Western blot

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Anti-MRP4 (Alexis Biochemicals) IgG de rata, dil: 1/50	Igs totales de cabra anti-IgG de rata (Santa Cruz Biotechnology); dilución 1/5000
Anti-BCRP (Alexis Biochemicals) IgG de ratón, dil: 1/300	Igs totales de oveja anti-IgG de ratón (Amersham); dilución 1/10000
Anti- β -actina (Sigma) IgG de ratón, dil: 1/2000	Igs totales de oveja anti-IgG de ratón (Amersham); dilución 1/10000
Anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology) IgG de ratón, dil: 1/100	Igs totales de oveja anti-IgG de ratón (Amersham); dilución 1/10000

Los anticuerpos fueron diluidos en leche descremada 2,5 % a excepción del anti-MRP4 que fue diluido en BSA 0,5%.

iii. Cuantificación relativa del efecto de HBV sobre la actividad de los promotores de MRP4 y BCRP

Con el objetivo de analizar si la replicación del HBV tenía algún efecto sobre los promotores de los genes *ABCC4/MRP4* y *ABCG2/BCRP* se transfectaron células de la línea HepG2.2.15 con construcciones de los promotores de MRP4 y BCRP clonados río arriba del gen luciferasa en el vector pGL3 Basic (Promega Biosciences Inc, CA, EE.UU.) (tabla MM3).

Se utilizaron dos plásmidos para medir la actividad del promotor de MRP4: en el primero de ellos se clonó un fragmento de 2372 pb, conteniendo las posiciones +48 a -2324 con respecto al TSS del gen de MRP4, en el vector reportero pGL3-Basic el cual fue denominado pMRP4-Luc 2,3 kb, mientras que el otro fragmento, de 1881 pb, va desde la posición +48 hasta la -1833 con respecto al TSS de dicho gen, y fue denominado pMRP4-Luc 1,8 kb. Dichos vectores fueron cedidos gentilmente por el grupo del Dr. Carlos Davio (Cátedra de Química Medicinal, FFyB, UBA).

El plásmido para medir la actividad del promotor de BCRP contiene un fragmento de 1647pb de la región promotora de BCRP que abarca desde la posición -1285 hasta +362 con respecto al TSS del gen, clonado en el vector reportero pGL3-Basic el cual fue denominado pBCRP-Luc. Dicho vector fue cedido gentilmente por el grupo del Dr. Hongbing Wang (Dto. de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad de Maryland).

Como control de células en las que no hay replicación viral se utilizó la línea HepG2/C3A, ya que ambas líneas celulares (HepG2/C3A y HepG2.2.15) derivan de la misma línea celular (HepG2) y presentan niveles comparables de eficiencia de transfección con el mismo método (utilizando el reactivo XtremeGENE, ver sección MM3.b.iii.2). En una placa de 24 pocillos, por cada pocillo se sembraron 60000 células HepG2/C3A ó 50000 células HepG2.2.15 y se utilizaron 0,75 µg ADN/pocillo y 1,5 µl de XtremeGENE.

Tabla MM3. Plásmidos utilizados en cada tratamiento de medición de actividad de los promotores de MRP4 y BCRP en presencia de replicación viral de HBV (actividad basal: actividad en células sin HBV).

Tratamiento	Línea celular	Plásmidos
Basal Promotor MRP4-2,3 Kb	HepG2/C3A	PromMRP4-2,3
Promotor MRP4-2,3 Kb con HBV	HepG2.2.15	PromMRP4-2,3
Basal Promotor MRP4-1,8 Kb	HepG2/C3A	PromMRP4-1,8
Promotor MRP4-1,8 Kb con HBV	HepG2.2.15	PromMRP4-1,8
Basal Promotor BCRP	HepG2/C3A	PromBCRP
Promotor BCRP con HBV	HepG2.2.15	PromBCRP

La actividad de luciferasa fue medida 48 h más tarde con el kit de luciferasa *Steady-Glo* (Promega Biosciences Inc, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando un espectrofotómetro para microplacas Multiscan GO (Thermo Scientific Inc., EE.UU.). La actividad de luciferasa así obtenida se normalizó mediante el número de células utilizando el kit *CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* de Promega (ensayo de MTS/PMS, ver sección MM4.a.i) y los datos se expresaron como un porcentaje respecto de las células donde no hay replicación viral (relación HepG2.2.15/HepG2/C3A).

b. Efecto de la proteína HBx sobre la expresión de transportadores ABC

Con el objetivo de analizar el efecto de la proteína HBx sobre la expresión de los transportadores ABC involucrados específicamente en el transporte de análogos de nucleótidos, se utilizaron dos plásmidos que tienen clonado el gen correspondiente a dicha proteína: uno de los plásmidos presenta la secuencia del gen salvaje o *wild type*, mientras que en el otro el gen presenta tres mutaciones (que en la proteína se traducen en las mutaciones I127T, L130M y V131I) asociadas a un aumento en el poder transactivador de la proteína HBx.

Ambos genes fueron obtenidos a partir de ADN viral presente en muestras de pacientes, correspondientes al genotipo F del virus. Los genes se encuentran clonados en el vector pT-Rex-DEST 31 (*Life Technologies*, EE.UU.).

Dichos plásmidos fueron obtenidos de la siguiente manera: se amplificó el gen *x* del HBV a partir de muestras provenientes del paciente RI [López et al, 2007; Mathet *et al*, 2007], cuya cepa del HBV exhibe las mutaciones I127T, L130M y V131I, y del paciente 33 [López *et al*, 2002] cuya población viral exhibe el genotipo salvaje para dicho gen. Dicho producto fue purificado y clonado por eventos de recombinación en el vector pDONR201 (*Life Technologies*, EE.UU.). Después de extraer y purificar al ADN plasmídico para su secuenciación nucleotídica y análisis de las secuencias obtenidas, se procedió a subclonar en el vector pT-Rex-DEST 31 para obtener los vectores de expresión pEXP-Xmut (mut: mutado) y pEXP-Xsal (sal: salvaje) [Castronuovo, 2015].

i. Puesta a punto de la transfección en células hepatocitarias

Para trabajar en condiciones donde se pudiera apreciar el efecto de la expresión de HBx, se procedió a optimizar las condiciones de transfección en cada una de las líneas celulares empleadas.

Para ello se utilizó Lipofectamina 2000 y Lipofectamina 3000 (*Life Technologies*, EE.UU.), L-polietilenimina o L-PEI de 25000 kDa (*Sigma*), FuGene 6 (*Roche*), X-tremeGENE HP (*Roche*), K2 transfection system (*Biontex*) en las condiciones descritas en la tabla MM4 según la línea celular.

Tabla MM4. Condiciones de transfección ensayadas en las distintas líneas celulares empleadas. Allí se indica la cantidad de reactivo de transfección/ μg de plásmido, o la relación N (nitrógeno del reactivo de transfección)/P (fósforo del ADN) en el caso de la transfección con L-PEI.

Línea celular	Reactivo de transfección	Relación reactivo: ADN
HuH7	Lipofectamina 2000	3 µl react: 1 µg ADN
	L-PEI	N/P=40
		N/P=80
	X-tremeGENE HP	1 µl react: 1 µg ADN
	K2	2 µl react: 1 µg ADN
		3 µl react: 1 µg ADN
		4 µl react: 1 µg ADN
5 µl react: 1 µg ADN		
HepG2	Lipofectamina 2000	3 µl react: 1 µg ADN
		4 µl react: 1 µg ADN
	L-PEI	N/P=10
		N/P=40
		N/P=50
		N/P=80
		N/P=100
	FuGene	2 µl react: 1 µg ADN
		3 µl react: 1 µg ADN
	X-tremeGENE HP	1 µl react: 1 µg ADN
		2 µl react: 1 µg ADN
		3 µl react: 1 µg ADN
		4 µl react: 1 µg ADN
		2 µl react: 3 µg ADN
		3 µl react: 2 µg ADN
		2 µl react: 1 µg ADN
	K2	3 µl react: 1 µg ADN
4 µl react: 1 µg ADN		
5 µl react: 1 µg ADN		
Lipofectamina 3000		1,5 µl react: 1 µg ADN
	3 µl react: 1 µg ADN	
HepG2/C3A	K2	2 µl react: 1 µg ADN
		3 µl react: 1 µg ADN
		4 µl react: 1 µg ADN
		5 µl react: 1 µg ADN
	Lipofectamina 3000	1,5 µl react: 1 µg ADN
HepG2.2.15	X-tremeGENE HP	2 µl react: 1 µg ADN
	Lipofectamina 3000	3 µl react: 1 µg ADN
	X-tremeGENE HP	2 µl react: 1 µg ADN

Por otro lado, además de variar la relación “reactivo de transfección: ADN”, también se evaluaron distintas cantidades de ADN. El plásmido utilizado

consistió en un vector que tiene clonado el gen eGFP (vector pEGFP-C3; figura MM2).

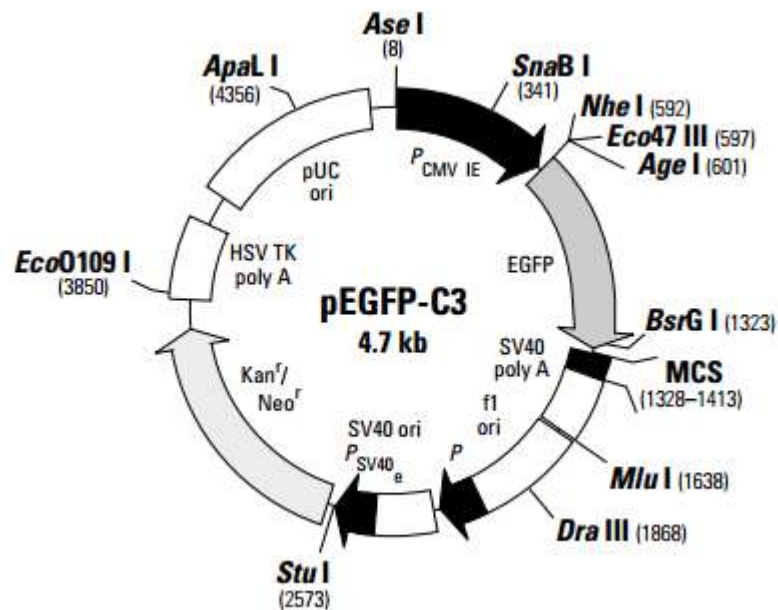


Figura MM2. Mapa de restricción y sitios de clonado del vector pEGFP-C3.

En el caso del sistema de transfección K2, se evaluó además la utilización de dos cantidades distintas de reactivo multiplicador (2,5 y 5 µl/pocillo), según las instrucciones del fabricante. Las pruebas se hicieron en placas de 24 pocillos.

Al día siguiente de la transfección, se determinó el porcentaje de eficiencia de transfección mediante citometría de flujo, según la cantidad de células fluorescentes o positivas para la marcación con eGFP.

Una vez determinadas las mejores condiciones de transfección para cada línea celular, se determinó el número de células por pocillo óptimo en cada caso.

ii. Amplificación de plásmidos mediante preparaciones de ADN (*miniprep* y *midiprep*) para transfección a pequeña y mediana escala

1. Obtención de bacterias electrocompetentes

Se cultivaron bacterias *Escherichia coli* -DH5α en 5 ml de LB durante toda la noche. Al día siguiente se tomaron 2,5 ml del cultivo y se inoculó en 250 ml de LB; se creció hasta una DO 600nm de 0,6-0,7. Una vez alcanzada esa DO se colocó en hielo por 30 min.

Luego se centrifugó a 4000 x g por 10 min. El *pellet* obtenido se resuspendió en 250 ml de agua bidestilada a 4°C.

Nuevamente se centrifugó a 4000 x g por 10 min, y el *pellet* obtenido se resuspendió en 100 ml de agua bidestilada a 4°C.

Se centrifugó nuevamente a 4000 x g por 10 min, y el *pellet* obtenido se resuspendió en 5 ml de agua bidestilada con 10% de glicerol, a 4°C.

Por último, se centrifugó a 4000 x g por 10 min, y el *pellet* obtenido se resuspendió en 0,5 ml de agua bidestilada con 10% de glicerol, a 4°C. Se tomaron alícuotas de 120 µl y se colocaron en tubos *eppendorf* de 1,5 ml. Las alícuotas fueron guardadas a -80°C.

2. Electroporación

Las bacterias fueron electroporadas con los plásmidos de interés en un electroporador Gene Pulser II (*BioRad*). Para ello se colocaron 100 µl de las bacterias electrocompetentes en una cuba de 0,1 cm, utilizando 5 µl de ADN plasmídico. Se utilizó un pulso de 2,5 kV, 100 Ω y 25 µF.

Luego se colocaron en 10 ml de medio LB sin antibiótico y se incubaron durante 1 h a 37°C para la recuperación de las bacterias.

Finalmente, se sembró 1 ml del cultivo anterior en una placa de LB-agar con antibiótico de selección. Al día siguiente se utilizaron las colonias obtenidas para la amplificación de plásmidos mediante *miniprep* o *midiprep*.

3. Miniprep

Se realizó un cultivo líquido de bacterias *Escherichia coli* transformadas con el plásmido de interés a amplificar (las bacterias fueron transformadas previamente por electroporación). Dicho cultivo se realizó en 10 ml de LB, con una cantidad apropiada del antibiótico de selección correspondiente, y se mantuvo durante toda la noche a 37°C con agitación.

Al día siguiente, en condiciones de esterilidad, se guardó un stock de cada cultivo bacteriano con glicerol. Para esto, se tomaron 850 µl del cultivo y se les agregaron 150 µl de glicerol estéril. Se guardó la mezcla a -80°C.

Luego, del cultivo restante se tomaron sucesivamente alícuotas de 1,5 ml en un tubo *eppendorf* y se centrifugó durante 1 min a 14000 x g, de manera de obtener un *pellet* con las bacterias, descartando el sobrenadante luego de cada centrifugación.

Una vez obtenido el *pellet* bacteriano, se resuspendieron las bacterias en 200 µl de buffer de resuspensión (50 mM glucosa, 25 mM Tris base pH 8, 10 mM EDTA pH 8). Se adicionaron 300 µl de *buffer* de lisis (preparada en el momento de usar, 0,2 N NaOH, 1 % SDS), se mezcló suavemente por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Luego se neutralizó por adición de 300 µl de solución de neutralización (3M KAc, pH 4,8), se mezcló suavemente por inversión y se incubó nuevamente en hielo durante 5 min.

Posteriormente, se removió el detrito celular por centrifugación durante 15 min a 14000 x g, y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo *eppendorf*. Se adicionaron 3 µl de ARNasa A (20 mg/ml, *Life Technologies*, EE.UU.) y se incubó durante 90 min a 37°C.

Luego de la incubación se extrajo el sobrenadante con 400 µl de cloroformo dos veces, mezclando las fases durante 30 seg por inversión, y centrifugando durante un min a 14000 x g cada vez, removiendo la fase acuosa a un tubo nuevo.

Luego se precipitó el ADN por adición de 600 µl de isopropanol y se centrifugó durante 15 min a 14000 x g. Se lavó el *pellet* de ADN con 500 µl de etanol 70%, se centrifugó 1 min a 14000 x g y se dejó secar a temperatura ambiente.

Una vez evaporado el etanol, se resuspendió el *pellet* de ADN en 32 µl de agua libre de ADNasas. Se adicionaron 8 µl de NaCl 4M y 40 µl de PEG 13% y se incubó hasta el día siguiente a 4°C de manera de precipitar el ADN.

Al día siguiente, se centrifugó durante 15 min a 14000 x g, a 4°C, se removió cuidadosamente el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 500 µl de etanol 70%, centrifugando 1 min a 14000 x g y dejando secar a temperatura ambiente.

Finalmente, se resuspendió el *pellet* obtenido en 20 µl de agua libre de ADNasas y se conservó a -20°C.

4. Midiprep

Las preparaciones de ADN plasmídico a mediana escala utilizadas para transfección fueron obtenidas mediante el sistema Pure Yield Plasmid Midiprep (*Promega Biosciences Inc*, CA, EE.UU.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, que se detallan a continuación.

Se realizó un cultivo líquido de bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido de interés a amplificar. Dicho cultivo se realizó en 100 ml de LB, con una cantidad apropiada del antibiótico de selección correspondiente, y se mantuvo durante toda la noche a 37°C con agitación.

Al día siguiente, se centrifugaron las células (alícuotas de 50 ml en tubos cónicos) a 5000 x g por 10 min, descartando el sobrenadante cada vez y se dejó escurrir al final para eliminar el medio de cultivo restante. Se resuspendieron las bacterias en 3 ml de solución de resuspensión. Luego, se agregaron 3 ml de solución de lisis y se mezcló por inversión, incubando 3 min a temperatura ambiente, después de lo cual se adicionaron 5 ml de solución de neutralización y se mezcló nuevamente por inversión, incubando nuevamente 2-3 min a temperatura ambiente.

Se vertió el lisado en una columna de “*clearing*” con el objetivo de eliminar el detrito celular. Se centrifugó a 1500 x g por 5 min y el líquido filtrado se colocó en una columna de “*binding*”. Se centrifugó a 1500 x g por 3 min y se descartó el líquido filtrado.

Se agregaron sobre la columna 5 ml de solución de remoción de endotoxinas y se centrifugó a 1500 x g por 3 min, descartando el líquido filtrado. Se agregaron 20 ml de solución de lavado y se centrifugó a 1500 x g por 5 min. Se descartó el líquido filtrado y se centrifugó durante 10 min adicionales para eliminar el etanol restante.

Finalmente, se eluyó el ADN plasmídico adicionando 600 µl de agua libre de nucleasas en la columna y centrifugando la misma a 1500 x g por 5 min. Se recolectó el líquido filtrado y se guardó a -20°C.

5. Cuantificación del ADN plasmídico

Una alícuota (1 µl) de los plásmidos purificados concentrados se sembraron en un gel de agarosa al 0,8% en *buffer* TBE, con 2,5 µl de un marcador de masa (*High DNA mass ladder*, *Life Technologies*), para calcular estimativamente la concentración en ng/µl. Luego se observó a través de un transiluminador UV y se capturó la imagen, lo que permitió la cuantificación de las bandas en píxeles mediante el programa “*Image-J*”.

iii. Transfección transitoria del gen X salvaje y mutado del HBV en células hepatocitarias

Según los resultados obtenidos en la puesta a punto descripta en la sección anterior, se procedió a transfectar las líneas celulares HuH7 y HepG2/C3A, que fueron aquellas en las que se consiguió una eficiencia igual o superior al 30%.

1. Transfección de células HuH7

En placas de 6 pocillos, se sembraron 3×10^5 células/pocillo el día anterior a la transfección en medio de cultivo DMEM 5% FBS (con este número de células se alcanza a las 24 h un 80% de confluencia, aproximadamente).

En el momento de la transfección, para cada pocillo se diluyeron 2,5 µg de ADN en 200 µl de DMEM sin suero, en un tubo *eppendorf*. En paralelo, en otro tubo *eppendorf* se diluyeron 8 µl de Lipofectamina 2000 (*Life Technologies*) en 200 µl de DMEM sin suero. Se dejó 5 min a temperatura ambiente.

Se adicionó la solución de ADN sobre la solución de Lipofectamina. Se mezcló suavemente y se incubó 25 min a temperatura ambiente.

Antes de la transfección, se cambió el medio de cultivo a las células por medio fresco. Luego se agregó la mezcla de complejos ADN-Lipofectamina correspondiente a cada pocillo, y se homogeneizó moviendo suavemente la placa.

2. Transfección de células HepG2/C3A

En placas de 6 pocillos, se sembraron 4×10^5 células por pocillo el día anterior a la transfección en medio de cultivo DMEM 10% FBS (con este número de células se alcanza a las 24 h un 50% de confluencia, aproximadamente).

Dado que la eficiencia de transfección con este reactivo es altamente dependiente del volumen de mezcla de transfección, nunca se prepara menos de 100 µl de mezcla de transfección. En el momento de la transfección se preparó

la mezcla de complejos de XtremeGENE y ADN: se colocaron 100 µl de DMEM (sin FBS) en un tubo *ependorf*, se agregó 3 µg de ADN plasmídico y se homogeneizó. Luego se agregó 6 µl de XtremeGENE y se mezcló nuevamente. Se incubó la mezcla de complejos por 30 minutos a temperatura ambiente.

Mientras tanto, se cambió el medio de cultivo a las células por medio fresco. Luego del tiempo de incubación, se agregó la mezcla de complejos de a gotitas sobre toda el área del pocillo correspondiente, y se homogeneizó moviendo suavemente la placa.

iv. Detección de la expresión de las proteínas X salvaje y mutada del HBV mediante Western blot

1. Obtención de extractos proteicos totales a partir de cultivos celulares

Al día siguiente de la transfección, 24 h después, se cosecharon las células transfectadas por tripsinización. Se obtuvieron los extractos proteicos de las células transfectadas según el protocolo descrito en la sección MM3.a.ii.1.

2. Fraccionamiento electroforético de las proteínas en SDS-PAGE

Se sometió a los lisados proteicos a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes según el protocolo descrito en la sección MM3.a.ii.2.

Se sembraron 50 µg de proteínas totales para cada muestra, con el objetivo de detectar la expresión de la proteína HBx salvaje o mutada. También se sembraron 4 µl de marcador de peso molecular (*BioRad*).

3. Western blot

Luego de la corrida electroforética, se procedió a la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de PVDF.

Una vez que las proteínas fueron transferidas se realizó el bloqueo de la membrana y la secuencia de lavados descritos en la sección MM3.a.ii.3.

Se realizó la inmunodetección con un anticuerpo monoclonal anti-6xHis (*BD Pharmingen*, *BD Biosciences*, EE.UU.), diluido 1/3000 en leche descremada 2,5% y se incubó O.N. a 4° C con agitación. Como anticuerpo secundario se empleó anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (*Amersham*); dilución 1/10000 en leche descremada 2,5%. Se realizó el revelado sobre placas radiográficas.

v. Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de transportadores ABC mediante PCR en tiempo real

1. Extracción de ARN a partir de cultivos celulares

Al día siguiente de la transfección con los plásmidos codificantes para HBx, 24 h después, se cosecharon las células por tripsinización. Se adicionaron 500 µl de TRIzol, se homogeneizó la mezcla y se continuó con el procedimiento según lo descrito en la sección MM3.a.i.1.

2. Síntesis de ADNc

Se procedió según lo descrito en la sección MM3.a.i.2.

3. Medición del ARNm de genes ABC mediante PCR en tiempo real

Se procedió según lo descrito en la sección MM3.a.i.3. para los ARNm de los transportadores BCRP, MRP4 y MRP5 (tabla MM1)

vi. Cuantificación relativa de los niveles de proteína de transportadores ABC mediante Western blot

Para la detección y cuantificación relativa de los transportadores ABC en los cultivos de células transfectadas con HBx, se procedió según lo detallado en la sección MM3.a.ii.

vii. Cuantificación relativa del efecto de la proteína HBx sobre los promotores de MRP4 y BCRP

Con el objetivo de determinar si la proteína HBx tenía algún efecto sobre los promotores de los genes *ABCC4* y *ABCG2* se realizaron ensayos de co-transfección de los plásmidos codificantes para HBx salvaje y mutada con plásmidos reporteros que tienen clonado el promotor de dichos genes río arriba del gen de luciferasa.

Se sembraron células HuH-7 (80000 células/pocillo) y HepG2/C3A (50000 células/pocillo) en placas de 24 pocillos, el día antes de la transfección.

Al día siguiente, se transfectaron las células HuH-7 con Lipofectamina 2000 y HepG2/C3A con XtremeGENE, según los protocolos descritos en la sección MM3.b.iii, utilizando las siguientes cantidades para la mezcla de transfección de cada pocillo:

HuH-7:

Tubo 1: 25 µl de DMEM + 0,5 µg de ADN plasmídico

Tubo 2: 25 µl de DMEM + 1,5 µl de Lipofectamina

HepG2/C3A:

25 µl de DMEM + 0,75 µg de ADN plasmídico + 1,5 µl de XtremeGENE

(cantidad mínima de mezcla de transfección: 100 µl)

Se utilizaron combinaciones de plásmidos para cada tratamiento, en proporción 1:1 (es decir, 0,25 µg de cada uno/pocillo para HuH7 y 0,375 µg de cada uno/pocillo para HepG2/C3A) detalladas en la tabla MM5. Se utilizó el vector pCEFL para completar la cantidad de ADN por tratamiento en los casos en los que se quería medir actividad basal de cada promotor (control sin HBx).

Tabla MM5. *Plásmidos utilizados en cada tratamiento de medición de actividad de los promotores de MRP4 y BCRP en presencia de las proteínas HBx-wt y HBx-mut.*

Tratamiento	Plásmidos
Basal Promotor MRP4-2,3 Kb	PromMRP4-2,3 + pCEFL
Promotor MRP4-2,3 Kb con HBx-wt	PromMRP4-2,3 + HBx wt
Promotor MRP4-2,3 Kb con HBx-mut	PromMRP4-2,3 + HBx mut
Basal Promotor MRP4-1,8 Kb	PromMRP4-1,8 + pCEFL
Promotor MRP4-1,8 Kb con HBx-wt	PromMRP4-1,8 + HBx wt
Promotor MRP4-1,8 Kb con HBx-mut	PromMRP4-1,8 + HBx mut
Basal Promotor BCRP	PromBCRP + pCEFL
Promotor BCRP con HBx-wt	PromBCRP + HBx wt
Promotor BCRP con HBx-mut	PromBCRP + HBx mut

La medición de actividad de luciferasa se llevó a cabo 48 h después de la transfección según lo descrito en la sección MM3.a.iii.

- c. Efecto del HBV sobre la vía de señalización de las MAPK y su regulador negativo MKP-1**
- i. Estudio del efecto de la expresión de la proteína X sobre la fosforilación de ERK1/2**

Con el objetivo de estudiar el efecto de la proteína viral HBx sobre la fosforilación de ERK1/2, se sembraron células HuH7 (3×10^5 células/pocillo) y se transfectaron de acuerdo a lo detallado en la sección MM3.b.iii.1. Los extractos proteicos fueron obtenidos 24 h después de la transfección.

1. Obtención de extractos proteicos totales a partir de cultivos celulares

Se retiró el sobrenadante del cultivo y se lavó dos veces con PBS. Se colocó cada placa sobre hielo y se añadieron 75 µl de *buffer* de lisis (20 mM Tris pH 7,4, 0,5% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM NaCl, 50 mM NaF, 40 mM glicerol-fosfato, 1 mM PMSF, 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml aprotinina, y 2 mM ortovanadato de sodio) a cada pocillo y se guardó a -80°C durante al menos 12 h. Luego se descongeló, manteniendo la placa en hielo y se desprendieron las células utilizando un *scraper*. El contenido de cada pocillo se colocó en un tubo

de 1,5 ml y se centrifugó a 1500 x g durante 10 min a 4°C, recuperando el sobrenadante. El mismo se guardó a -80°C hasta su utilización.

2. Fraccionamiento electroforético de las proteínas en SDS-PAGE

Se procedió de acuerdo a lo descrito en la sección MM3.a.ii.2. Se sembraron 30 µg de proteínas en un gel 10% de poliacrilamida.

3. Western blot

Se procedió de acuerdo a lo descrito en la sección MM3.a.ii.3. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF y la detección se realizó utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-P-ERK1/2 (*New England Biolabs Inc.*, Beverly, MA, USA), dilución 1/1000 en solución de BSA 1% en TBS-T, y como anticuerpo secundario inmunoglobulinas totales de cabra anti-IgG de conejo conjugadas a HRP (*Amersham*); dilución 1/5000 en leche descremada en polvo al 2,5% en TBS-T.

4. Remoción de los complejos anticuerpo primario-anticuerpo secundario para la detección posterior de otro antígeno (proteína no fosforilada)

Luego del revelado, las membranas se mantuvieron en TBS-T a 4° C. Para disgregar los complejos “anticuerpo primario-anticuerpo secundario”, las membranas se sumergieron en *buffer* de remoción (*Stripping Buffer*: Tris-HCl 62,5 mM pH=6,7, 2-Mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%) durante 30 min a 50° C con esporádica agitación manual. Se realizaron dos lavados, de 10 min cada uno, en TBS-T y se realizó el bloqueo con leche descremada en polvo al 5% en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Luego de un lavado con TBS-T durante 10 min, se procedió a la incubación con el anticuerpo policlonal anti- ERK1/2 total (*New England Biolabs Inc.*, Beverly, MA, USA), en una dilución 1/10000 en solución de BSA al 1 % en TBS-T, durante toda la noche a 4° C con agitación.

Posteriormente, se realizó el esquema de lavados descrito en MM3.a.ii.3 y luego las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con HRP (*Amersham*) en una dilución 1/5000 en leche descremada en polvo al 2,5% en TBS-T, durante 3 h con agitación. Finalmente, luego de repetir el mismo esquema de lavados, se procedió al revelado de la misma forma detallada en la sección MM3.a.ii.3.

ii. Estudio del efecto de la replicación del HBV y de la expresión de la proteína X sobre la expresión del ARNm de MKP-1

Con el objetivo de determinar el efecto de la replicación viral y de la proteína HBx sobre MKP-1 se diseñó una RT-PCR multiplex para los ARNm de *MKP-1* y *β -ACTINA*.

En primer lugar, se sembraron células HepG2 (5×10^5 células/pocillo) y HepG2.2.15 ($7,5 \times 10^5$ células/pocillo) en placas de 6 pocillos. Las células fueron cosechadas 24 h después.

Por otro lado, se sembraron células HuH7 (3×10^5 células/pocillo) y se transfectaron de acuerdo a lo detallado en la sección MM3.b.iii.1. Las células fueron cosechadas 24 h después de la transfección.

En ambos casos, las células fueron almacenadas en 500 μ l de TRIzol a -80°C hasta su posterior utilización.

1. Extracción de ARN a partir de cultivos celulares

Se procedió de acuerdo a lo descrito en la sección MM3.a.i.1.

2. Síntesis de ADNc

Se procedió de acuerdo a lo descrito en la sección MM3.a.i.2, pero se tomó el volumen equivalente a 2 μ g de ARN de cada muestra para la reacción de transcripción inversa (síntesis de ADNc)

3. Medición de variaciones relativas del ARNm de MKP-1 mediante PCR semicuantitativa

La PCR Multiplex es una variante de la técnica de PCR en la cual se emplean 2 ó más pares de *primers* en una misma reacción a fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN de una muestra. Es una técnica semicuantitativa, ya que permite estimar cantidades relativas de expresión de cierto gen, utilizando un gen *housekeeping* como control de carga (en este caso, el gen *MKP-1* fue el gen cuya expresión se quería estudiar y *β -ACTINA* se utilizó como *housekeeping*).

El protocolo empleado se resume a continuación:

Reactivo	Volumen (μl)
Agua	13,8
Buffer 10X	2
dNTPs 10mM	0,4
MgCl ₂	0,8
Primers MKP-1 (F y R) 10 μM	0,8
Taq polimerasa (Life Technologies)	0,2
ADNc	2
<u>Ciclado para HepG2 y HepG2.2.15</u>	
94°C – 5 min	
94°C – 30 seg	10 ciclos
60°C – 30 seg	
72°C – 30 seg	
Se agregan 0,4 μl de primers de β-ACTINA (F y R) 5μM a cada tubo	
Se repiten 20 ciclos de 94°C – 30 seg, 60°C – 30 seg y 72°C – 30 seg	
72°C – 10 min	
<u>Ciclado para HuH-7</u>	
94°C – 5 min	
94°C – 30 seg	12 ciclos
60°C – 30 seg	
72°C – 30 seg	
Se agregan 0,4 μl de primers de β-ACTINA (F y R) 5 μM a cada tubo	
Se repiten 18 ciclos de 94°C – 30 seg, 60°C – 30 seg y 72°C – 30 seg	
72°C – 10 min	

Las secuencias de *primers* específicos utilizados para cada gen se detallan en la tabla MM6.

Tabla MM6. Secuencias de los primers utilizados en la PCR-Multiplex para la cuantificación relativa del ARNm de MKP-1

Nombre	Secuencia
MKP-1 –F	5'-CCTCAAAGGAGGATACGAAGC-3'
MKP-1 – R	5'-GCTCTTGTACTGGTAGTGACC-3'
β-ACTINA – F	5'-GGACCTGACTGACTACCTCATGAA-3'
β-ACTINA – R	5'-GATCCACATCTGCTGGAAGGTGG-3'

Los productos de la RT-PCR Multiplex se sembraron en un gel de agarosa al 1,5% en *buffer* TBE teñido con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml), junto a un marcador de peso molecular de 100 pb. El fraccionamiento electroforético se realizó a 100 V durante 1 h. El tamaño esperado de los productos de PCR es de 523 pb para β -ACTINA y 317 pb para MKP-1.

Luego de la corrida electroforética se visualizaron las bandas en un transiluminador de UV y posteriormente se realizó la captura de imágenes. La expresión relativa de los ARNm de MKP-1 se relativizó con β -ACTINA. Para ello, se realizó un análisis comparativo del área de las bandas con el programa *ImageJ* (NIH, Bethesda, Maryland, USA).

MM 4.DESARROLLO DE ESTRATEGIAS TECNOLÓGICAS TENDIENTES A OPTIMIZAR LA TERAPÉUTICA CONTRA EL HBV

a. Estudio del efecto de diferentes análogos de nucleósidos desarrollados en nuestro país en el contexto de un sistema *in vitro* de replicación del HBV

i. Evaluación de citotoxicidad (método de MTS/PMS)

Se sembraron células HepG2.2.15 en placas de 96 pocillos (3 x 10⁴ células/pocillo) y se incubaron en DMEM suplementado con 10% SFB por 24 h a 37°C. Las soluciones de trabajo se prepararon en DMEM con 10% de SFB, y luego fueron filtradas a través de filtros de 0,2 μ m. Luego se removió el medio de cultivo y se lo reemplazó por diluciones con distinta concentración de cada análogo de nucleósido a ensayar (1,5 μ M; 10 μ M; 25 μ M; 50 μ M y 100 μ M; ver sección MM2.b). Las células fueron incubadas por 24 y 72 h a 37°C y la actividad citotóxica se determinó mediante el ensayo de MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Se midió la absorbancia a 495 nm mediante un espectrofotómetro para microplacas Multiscan GO (*Thermo Scientific Inc.*, EE.UU.).

El ensayo de MTS es un método colorimétrico basado en la reducción del MTS a formazán en presencia de metosulfato de fenazina (PMS). La cantidad de formazán medido por la absorbancia a 495 nm es directamente proporcional al

número de células vivas. Las principales aplicaciones de este método son para el análisis de la viabilidad y proliferación celular.

La citotoxicidad de los ANs se calculó según el porcentaje de células vivas con cada tratamiento de la siguiente manera:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{DO \text{ células tratadas}}{DO \text{ células control negativo}} \times 100$$

DO: absorbancia a 495 nm

El ensayo se realizó por triplicado, incluyendo los controles correspondientes: como control negativo se emplearon células que fueron mantenidas con medio de cultivo sin la adición de droga a ensayar y como control positivo, células tratadas con DMSO al 2%.

ii. Estudio del efecto de los análogos de nucleósidos sobre la replicación del HBV

Con el objetivo de evaluar la actividad antiviral de distintos análogos nucleosídicos sintetizados por el grupo dirigido por la Dra. Albertina Moglioni (Cátedra de Química Medicinal, FFyB, UBA), se utilizó la línea celular HepG2.2.15, a la cual se le adicionaron individualmente durante 7 días los 4 análogos nucleosídicos (ANs) obtenidos mediante síntesis química a partir del 2-amino-1-indanol en la mayor de las concentraciones ensayadas no citotóxicas: 100 μM para los compuestos 1, 2 y 3, y 25 μM para el compuesto 4 (figura MM1). Dichas soluciones fueron preparadas a partir de una solución madre 200 mM (en DMSO) de cada compuesto. Las soluciones de trabajo se prepararon en DMEM con 10% de SFB, y fueron luego filtradas a través de filtros de 0,2 μm .

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (7×10^5 células/pocillo) en DMEM con 10% de SFB. Al día siguiente se comenzó la incubación con las concentraciones correspondientes de cada AN y se hizo recambio de solución cada 48 h. A los 7 y 10 días de comenzado el experimento se recolectó el sobrenadante con el objetivo de medir en este HBsAg y HBeAg, y luego carga viral de HBV solo para aquellos compuestos en los que hubiera una reducción en la producción de dichos antígenos virales. Para ello, se tomó una alícuota de 1 ml de los sobrenadantes provenientes de los cultivos y se cuantificó el ADN del HBV (*Real Time PCR*), utilizando *primers* y sondas de hibridación específicas para la región “*pre-core/core*” mediante el kit comercial COBAS Ampliprep/COBAS Taq Man HBV (*ROCHE Diagnostics*). Los antígenos virales fueron determinados en forma cualitativa y semicuantitativa mediante el método CMIA (Inmunoensayo quimioluminiscente, técnica de micropartículas).

b. Estudio de la acción de co-polímeros lineales y ramificados de PEO-PPO sobre la expresión de transportadores ABC

i. Evaluación de citotoxicidad

Del mismo modo que se procedió con los ANs, antes de evaluar si los co-polímeros de PEO y PPO presentaban algún efecto sobre la expresión de proteínas de la familia ABC o algún efecto antiviral intrínseco se determinó la citotoxicidad de los mismos, a fin de ensayar luego sólo concentraciones citocompatibles. Para ello, se procedió de la manera detallada en la sección MM4.a.i, pero utilizando diferentes concentraciones (0,01; 0,1 y 1%) de las poloxaminas Tetronic® T304, T904, T1107 y T1301 y el poloxámero Pluronic® F127 en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Además de evaluar la citotoxicidad sobre células HepG2.2.15, se evaluó también sobre células HuH-7 de manera análoga.

ii. Estudio del efecto de los poloxámeros y poloxaminas estudiados sobre los niveles de ARNm de los transportadores ABC

Una vez determinadas las concentraciones citocompatibles de poloxámero y poloxaminas para las células HuH-7 y HepG2.2.15, se procedió a evaluar el efecto sobre la expresión de algunos de los miembros más representativos de la familia de transportadores ABC.

En primer lugar, se sembraron células HuH-7 en placas de 6 pocillos (5×10^5 células/pocillo). Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por soluciones de medio de cultivo con concentraciones citocompatibles de los compuestos a ensayar (tabla MM7).

Tabla MM7. Concentraciones ensayadas de cada co-polímero en células HuH-7

Co-polímero	Concentración
T304	0,1 y 1%
T904	0,01%
T1107	0,01%
T1301	0,01%
F127	0,1 y 1%

Al cabo de 72 h de incubación, se cosecharon las células y se almacenaron en 500 µl de TRIzol a -80°C. Luego se procedió según lo descripto en la sección MM3.a.i y se cuantificó la expresión relativa de los ARNm de *ABCB1/MDR1*, *ABCC1/MRP1* y *ABCG2/BCRP* mediante RT-qPCR (tabla MM8).

Tabla MM8. Oligonucleótidos empleados para las reacciones de PCR en tiempo real

Nombre	Secuencia
BCRP – F	TATAGCTCAGATCATTGTCACAGTC
BCRP – R	GTTGGTCGTCAGGAAGAAGAG
MDR1 – F	TGCTCAGACAGGATGTGAGTTG
MDR1 – R	AATTACAGCAAGCCTGGAACC
MRP1 – F	GCCAAGAAGGAGGAGACC
MRP1 – R	AGGAAGATGCTGAGGAAGG
18S- F	TAACCCGTTGAACCCATT
18S – R	CCATCCAATCGGTAGTAGCG

Luego, teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la línea celular HuH-7, se procedió de manera análoga con la línea celular HepG2.2.15: se sembraron 4×10^5 células/pocillo y al día siguiente se cambió el medio de cultivo por soluciones de medio de cultivo con concentraciones citocompatibles de los compuestos a ensayar (tabla MM9).

Tabla MM9. Concentraciones ensayadas de cada co-polímero en células HepG2.1.15.

Co-polímero	Concentración
T304	0,1 y 1%
T904	0,01%
F127	0,1 y 1%

Al cabo de 72 h de incubación, se cosecharon las células y se almacenaron en 500 μ l de TRIzol a -80°C . Luego se procedió según lo descrito en la sección MM3.a.i y se cuantificó la expresión relativa de los ARNm de *ABCB1/MDR1*, *ABCC1/MRP1*, *ABCG2/BCRP*, *ABCC4/MRP4* y *ABCC5/MRP5* mediante RT-qPCR (tabla MM1 y MM8).

c. Diseño de formulaciones droga-co-polímero y estudio de su efecto *in vitro*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se seleccionó el análogo de nucleósido que presentó mayor actividad antiviral y se generaron formulaciones con el co-polímero que presentó mayor actividad antiviral, así como menor efecto sobre las bombas ABC: el poloxámero F127. A partir de dicha combinación se estudió tanto su efecto antiviral así como el impacto sobre la expresión de los transportadores ABC.

i. Sobre la replicación del HBV

Se prepararon soluciones del compuesto **4**, derivado de purina (9-(1-hidroxi-Indan-2-il)-6-cloro-purina) 25 μ M, con el poloxámero F127 al 0,1%. Las soluciones de trabajo se prepararon en DMEM con 10% de SFB, y luego fueron filtradas a través de filtros de 0,2 μ m. El ensayo se llevó a cabo según se indica en la sección MM4.a.ii, con recambio del medio de cultivo cada 48 h, y se recuperó el sobrenadante para medición de antígenos virales y carga viral a los 7 y 10 días.

ii. Sobre la expresión del ARNm de los transportadores ABC

Al cabo de los 10 días de incubación, se cosecharon las células y se almacenaron en TRIzol a -80°C. Luego se procedió según lo descrito en la sección MM3.a.i y se cuantificó la expresión relativa de los ARNm de *ABCB1/MDR1*, *ABCC1/MRP1*, *ABCG2/BCRP*, *ABCC4/MRP4* y *ABCC5/MRP5* mediante RT-qPCR (tabla MM1 y MM8).

MM 5. ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESISTENCIA A DROGAS ANTIVIRALES EN PACIENTES CRÓNICAMENTE INFECTADOS CON HBV

Con el objetivo de estudiar en pacientes crónicamente infectados con HBV la presencia de características del virus y del paciente que pudieran favorecer la aparición de resistencia a la terapéutica antiviral, se estudiaron tanto mutaciones presentes en el genoma viral a partir de ADN aislado del suero del paciente, así como polimorfismos en el gen *ABCC4* a partir de ADN aislado de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

En primer lugar, se determinaron los marcadores virales para HAV, HCV y HIV, de manera de asegurarnos de trabajar solo con muestras de pacientes monoinfectados con HBV. Con respecto a los marcadores para HBV se estudió la presencia de HBsAg, anticuerpos anti-HBs, anticuerpos anti-HBc totales, HBeAg, y anticuerpos anti-HBe en el hospital del cual fueron derivadas las muestras (Hospital General de Agudos “Dr. Cosme Argerich”), utilizando el kit comercial AxSYM (Abbott Laboratories, Chicago, EE.UU.). De esta forma se garantizó que las muestras cumplieran con el perfil requerido para el estudio.

a. Estudio de mutaciones en el dominio de Transcriptasa Inversa (TI) del gen *pol* del HBV asociadas a la resistencia a drogas antivirales

i. Extracción de ADN viral aislado de suero del paciente

La extracción del ADN de HBV se realizó a través del método de lisis alcalina.

Se colocaron 20 µl de suero en un tubo *eppendorf* de 1,5 ml. Se adicionaron 20 µl de una solución de NaOH 0,1N seguido de homogeneización, luego se adicionaron 60 µl de agua destilada estéril seguido de homogeneización y se incubó 15 min a 95° C; posteriormente se enfrió en hielo. Luego, para neutralizar, se adicionaron 20 µl de una solución de HCl 0,1N. Se centrifugó durante 15 min a 12000 x g y se transfirió cuidadosamente el sobrenadante a un tubo de 1,5 ml. Se conservó a -80°C hasta su posterior utilización.

ii. Reacción de PCR para el gen *pol* del HBV

Se amplificó el ADN viral sérico mediante PCR con dos pares de *primers*: S1R y YS1 [Zeng *et al.*, 2004], y HBs1 y HBs2. En caso de que la PCR fuera negativa, se procedió a realizar una *nested-PCR* con *primers* más internos: P7 y P8 [Lindh *et al.*, 1997].

Los productos de PCR se sembraron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Se realizó la corrida electroforética a 100 V.

A continuación se detallan las secuencias de los *primers* utilizados (tabla MM10), así como las condiciones de cada reacción.

Tabla MM10. Secuencias de los primers utilizados para amplificar la región correspondiente al dominio TI del gen *pol* de HBV y tamaño de los amplímeros.

Primer	Secuencia	Tamaño del amplímero
HBs1 (F)	5'-GGTGAGAACATCACATCAGG-3'	672 pb
HBs2 (R)	5'-GAGCGTTTATGTATACCCA-3'	
S1R (R)	5'-TTAGGGTTTAAATGTATACCCA-3'	640 pb
YS1 (F)	5'-GCGGGGTTTTTCTTGTGA-3'	
P7 (F)	5'-GTGGTGGACTTCTCTCAATTTTC-3'	541 pb
P8 (R)	5'-CGGTA(A/T)AAAGGGACTCA(A/C)GAT-3'	

En la figura MM3 se muestran los fragmentos del dominio TI amplificado del gen de la polimerasa viral.

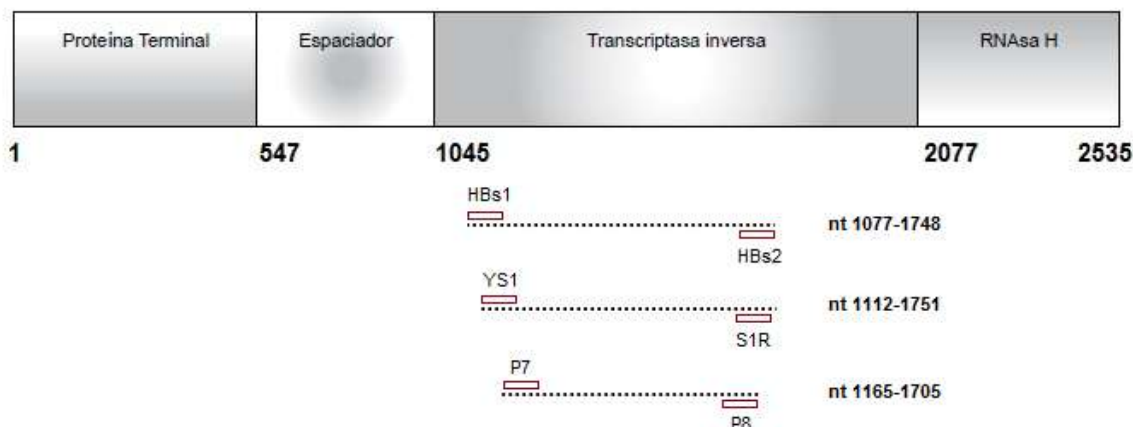


Figura MM3. Se muestra el gen viral pol señalando las secuencias correspondientes a cada dominio proteico, así como los fragmentos del dominio TI amplificados con cada par de primers.

Protocolo de reacción de PCR:

Reactivo	Volumen (µl)
Agua	39,5
Buffer 10X	6
dNTPs 10mM	0,8
MgCl ₂	1,2
Primers HBs1 y HBs2 5 µM	1
ó	
Primers S1R y YS1 5 µM	
Taq polimerasa (Life Technologies)	0,5
ADN	10
94°C – 3 min	
94°C – 45 seg	35 ciclos
46°C – 60 seg	
72°C – 90 seg	
72°C – 7 min	

Protocolo de reacción *nested*-PCR:

Reactivo	Volumen (μl)
Agua	37,2
Buffer 10X	6
dNTPs 10mM	0,8
MgCl ₂	3,5
Primers P7 y P8 10 μM	1
Taq polimerasa (Life Technologies)	0,5
ADN	10
94°C – 3 min	
94°C – 45 seg	40 ciclos
53°C – 60 seg	
72°C – 90 seg	
72°C – 7 min	

iii. Genotipificación del HBV mediante secuenciación nucleotídica y análisis filogenético de las secuencias obtenidas del producto de PCR

Se realizó la secuenciación nucleotídica por el método de la terminación de cadena mediante la utilización de didesoxinucleótidos [Sanger *et al.*, 1977] con los *primers* correspondientes según el resultado obtenido, en presencia de un terminador de cadena marcado con reactivos fluorescentes. Esto fue realizado a través del servicio de secuenciación de la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Buenos Aires) o a través del servicio de secuenciación Standar-Seq de Macrogen (*Macrogen*, Corea). Los productos de PCR fueron secuenciados bidireccionalmente y los resultados de la secuenciación fueron analizados utilizando el programa *BioEdit* (Hall T., North Carolina University, EE.UU.).

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron alineadas con secuencias del GenBank de cepas del HBV provenientes de otras regiones geográficas del mundo correspondientes a los genotipos A-I: M57663, AB246338 y AB194952 para el genotipo A; AB106885, AY217358, D00331, AB031266, AB241117, DQ463789, AP011088 y AP011093 para el genotipo B; AB105174, AB112063, AB117758, AP011098, AB014381, AB205124, AB033551, AB049609, X75665, X75656, AB048704, AB048705, EU410080, EU410081, AP011100, AP011102, AP011103, EU670263, AP011104, AP011106, AP011107, AP011108 y

AB540583 para el genotipo C; AB104712, AB090268, J02203, U95551, DQ486024, AB033559, DQ315780 y AB493846 para el genotipo D; X75657 para el genotipo E; AY090458, AY090459, AY179735, AB116552, AF223964, AB086397, AY311369, X69798, AY311370, AB036911, AF223965, AY179734, AF223962, AB214516 y AB166850 para el genotipo F; AB056516 para el genotipo G; AP007261 para el genotipo H y FJ023660 para el genotipo I. Para ello se utilizó el programa *BioEdit*.

Las distancias filogenéticas fueron usadas en la construcción de un árbol filogenético por medio del método de *Neighbor-joining* (NJ) del programa MEGA versión 6.0 [Tamura *et al.*, 2013].

b. Estudio de polimorfismos en el gen *ABCC4/MRP4* asociados a trastornos en la actividad funcional de dicha bomba

i. Extracción de ADN a partir de muestras de sangre

Se obtuvo ADN de cada paciente a partir de muestras de sangre utilizando el kit comercial ADN Puriprep S-kit (*Inbio Highway*, Tandil, Buenos Aires).

En un tubo de 1,5 ml se colocaron 400 µl de sangre y se agregaron 600 µl de solución isotónica de lisis de eritrocitos. Se homogeneizó por inversión y se incubó durante 3-4 min hasta observar que la mezcla se haya vuelto transparente. Se centrifugó 5 min a 3000 x g y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 20 µl de solución de proteasa y 150 µl de PBS, luego se agitó en vortex de manera de mezclar el sedimento celular. Se agregaron 200 µl de *buffer* de lisis y se mezcló por inversión. Luego de un pulso/ *spin* en la microcentrífuga se incubó por 15 min a 56°C. Se realizó nuevamente un pulso en centrífuga, a fin de hacer bajar las microgotas condensadas en la tapa del tubo durante la incubación. Se agregaron 200 µl de etanol, se agitó por inversión y nuevamente se repitió el pulso en la centrífuga.

Se colocó el contenido del tubo en una columna de extracción, colocada sobre un tubo colector. Se centrifugó a 12000 x g durante un min, descartando el líquido filtrado. Se agregaron a la columna 500 µl de *buffer* de lavado (1) y se centrifugó a 12000 x g durante 1 min, descartando el líquido filtrado. Se lavó la columna con 500 µl de *buffer* de lavado (2) y se centrifugó a 12000 x g durante 3 min. Se descartó el líquido filtrado y se repitió la centrifugación anterior, para eliminar cualquier vestigio del *buffer* de lavado.

Se colocó la columna en un microtubo limpio de 1,5 ml, y se agregaron 200 µl de *buffer* de elución (pH: 9), incubando 5-10 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 12000 x g por 2 min. El ADN eluido se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización.

ii. Reacciones de PCR para la detección de polimorfismos en el gen *ABCC4/MRP4*

A partir del ADN obtenido de cada paciente, se amplificaron regiones correspondientes a polimorfismos o mutaciones reportadas en la bibliografía que podrían llegar a tener importancia clínica (tabla MM11). En la selección de los polimorfismos a estudiar se tuvo en cuenta no solo su impacto en la actividad de la bomba a estudiar, sino su frecuencia en la población.

Tabla MM11. Se indican los polimorfismos estudiados del gen *ABCC4/MRP4*, la secuencia de los primers utilizados y el tamaño del amplímero obtenido.

Polimorfismo y cambio de aminoácido (ubicación)	Primer	Secuencia	Tamaño del amplímero
rs11568658 Gly187Trp (exón 5)	187-F 187-R	5'-CGAGCTATGATCCTGCCACTGC-3' 5'-GGTGGGGATGCTTGTGCTTAGA-3'	327 pb
rs2274407 Lys304Asn (exón 8)	304E8-F 304E8-R	5'-TTCCAGCACATGATACTTCTTATG-3' 5'-GACACCCTCTCAATGGCTGAG-3'	430 pb
rs2274407 Lys304Asn (exón 7)	304E7-F 304E7-R	5'-CAACTTTCACGGATGCCAGGATC-3' 5'-CTATAACTTGTCCATTGGCTAC-3'	477 pb
rs753414892 Tyr556Cys (exón 13)	556-F 556-R	5'-CAGCTGTTGGAGGATGGTGATC-3' 5'-GTTCGAACAAGTGTCTGCTAAC-3'	378 pb
rs11568707 Cys956Ser (exón 23)	956-F 956-R	5'-GGCTTGGTTCTTGTTTTTGAC-3' 5'-TCACAACTACCAGACACTAACAG-3'	384 pb
rs11568644 Thr1142Arg (exón 27)	1142-F 1142-R	5'-GAACCTGTTTTGTTCACTGGAAC-3' 5'-CTAGTTTAACGCATTGCTAAAGAC-3'	364 pb
rs3742106 (3'UTR)	3UTR-F 3UTR-R	5'-GAAATTATCCACATATTGGTCAC-3' 5'-CATTTAACTGGTGGCCTGC-3'	339 pb

El protocolo de PCR empleado fue el siguiente:

Reactivo	Volumen (μl)
Agua	39,5
Buffer 10X	6
dNTPs 10mM	0,8
MgCl ₂	1,2
Primers F y R 5 μM	1
Taq polimerasa (Life Technologies)	0,5
ADN	10
CICLADO PARA LOS POLIMORFISMOS EN EXONES 7, 8, 13, 23 Y 27:	
94°C – 3 min	
94°C – 45 seg	40 ciclos
50°C – 45 seg	
72°C – 60 seg	
72°C – 7 min	
CICLADO PARA EL POLIMORFISMO EN 3'UTR:	
94°C – 3 min	
94°C – 45 seg	10 ciclos
57°C – 45 seg	
72°C – 60 seg	
94°C – 45 seg	30 ciclos
55°C – 45 seg	
72°C – 60 seg	
72°C – 7 min	

iii. Análisis de las secuencias obtenidas del producto de PCR para la detección de polimorfismos en el gen *ABCC4/MRP4*

La secuenciación nucleotídica de los productos de PCR se realizó a través del servicio de secuenciación Standar-Seq de Macrogen (*Macrogen*, Corea). Los productos de PCR fueron secuenciados bidireccionalmente y los resultados de la secuenciación fueron analizados utilizando el programa *BioEdit* (Hall T., North Carolina University, EE.UU.).

Se tomaron como referencia para los alineamientos las secuencias NT_009952.14, AC_000056.1 y AC_000145.1 (*NCBI Reference Sequence*), correspondientes al cromosoma 13 del genoma humano.

MM 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Todos los ensayos fueron llevados a cabo por duplicado o triplicado (según se indica en cada sección) en al menos tres experimentos independientes.

Los datos fueron analizados mediante un test “*t de Student*” por comparación entre cada tratamiento y su respectivo control, comparando el promedio de las réplicas. Las diferencias respecto a los controles (*) fueron consideradas estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

Para ello se utilizó el programa Prism 6.01 (*GraphPad Software*, San Diego, CA).

RESULTADOS

*“Soy de las que piensan
que la ciencia tiene una
gran belleza. Un científico
en su laboratorio no es sólo
un técnico: es también un
niño colocado ante
fenómenos naturales que le
impresionan como un
cuento de hadas.”*

Marie Curie

CAPÍTULO 1

ESTUDIO DEL EFECTO DEL HBV SOBRE LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES ABC

R1. 1. Efecto de la replicación del HBV sobre la expresión de transportadores ABC

a. Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de transportadores ABC mediante PCR en tiempo real

Con el objetivo de evaluar si la presencia y replicación del HBV afecta la expresión de transportadores de la familia ABC involucrados en el transporte de análogos de nucleósidos hacia el exterior de la célula, lo primero que se hizo fue estudiar las abundancias relativas de ARNm de dichos transportadores en células donde hay replicación del HBV comparativamente con el nivel de dichos ARNm en células donde no hay replicación viral. Para ello, se midió el nivel de ARNm de los transportadores BCRP, MRP4 y MRP5 en células HepG2.2.15 (modelo *in vitro* de replicación del HBV) respecto de células HepG2 (donde no hay replicación viral), por PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR).

Previamente, se realizaron curvas de calibración para cada uno de los pares de *primers* a utilizar, donde se calcularon las pendientes de las rectas obtenidas para determinar si la eficiencia de las reacciones es cercana a 1 y si las mismas se correspondían con la de la reacción de amplificación del gen *housekeeping* 18S, el cual se utilizó para relativizar todos los resultados. A continuación se muestra sólo un ejemplo a modo ilustrativo (figura R1).

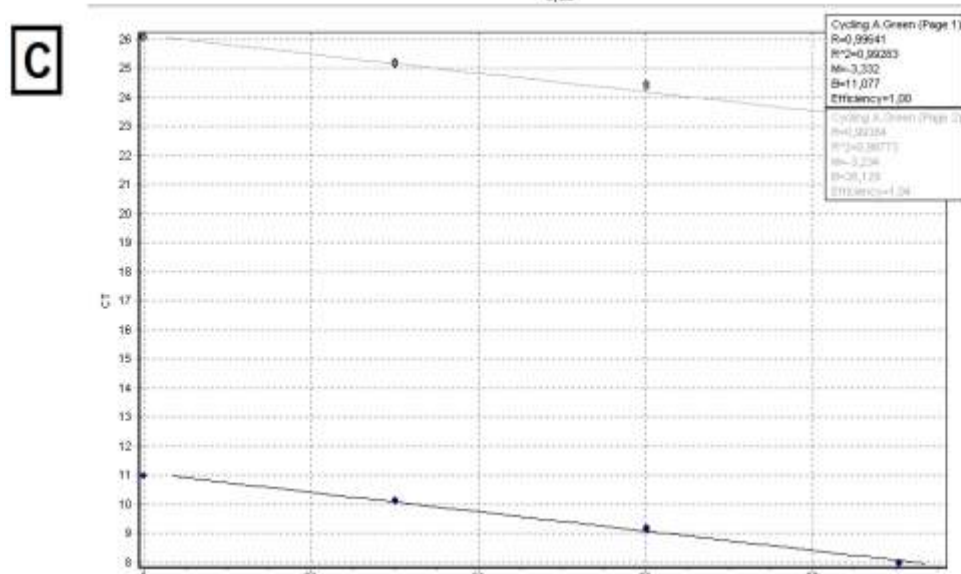
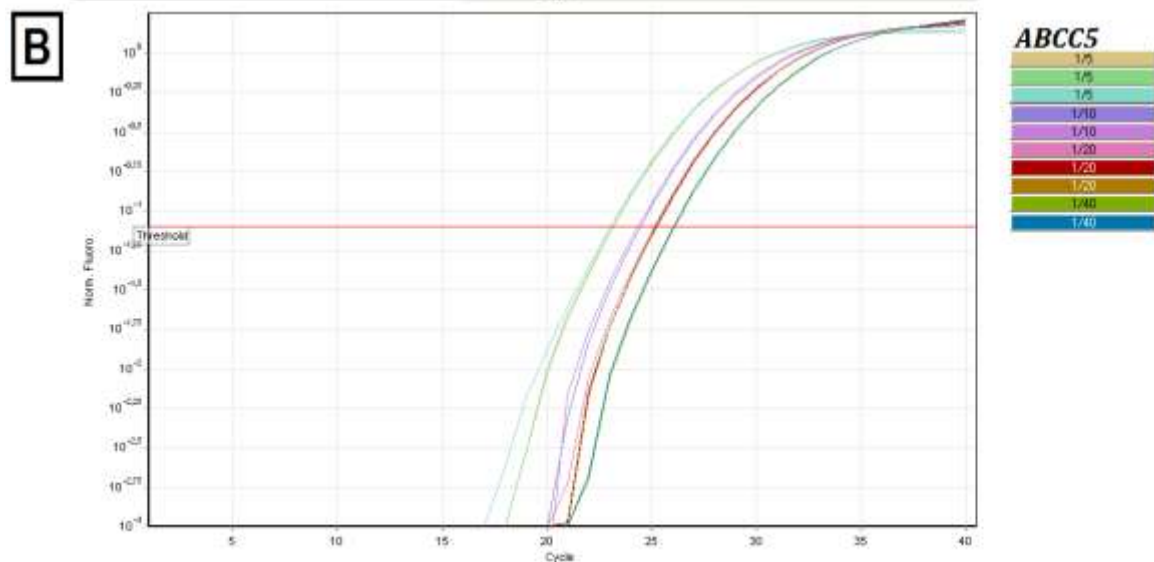
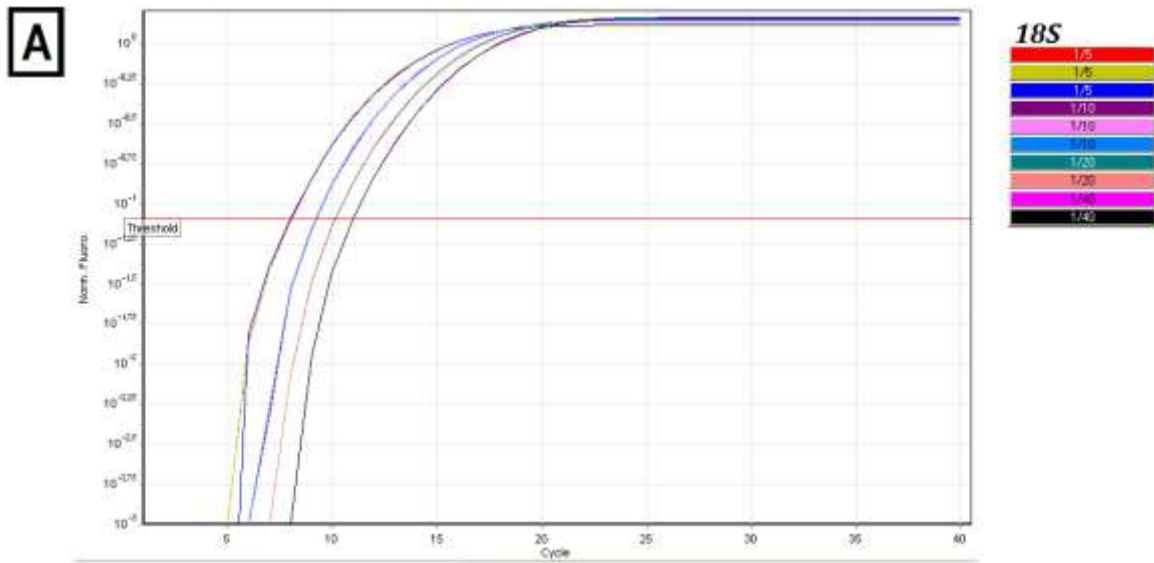


Figura R1. Curva de calibración realizada con los oligonucleótidos para 18S **(A)** y ABCC5/MRP5 **(B)**. Se exhiben las diluciones de la muestra (en este caso, ADNc de células HepG2) con los colores respectivos de las curvas para cada gen. Las diluciones se realizaron por triplicado. **(C)** Rectas correspondientes a las curvas de calibración mostradas en A y B. La recta inferior y el recuadro superior derecho (negro) corresponden a la eficiencia de los oligonucleótidos para 18S. La recta superior y el recuadro inferior derecho (gris) corresponden a la eficiencia obtenida utilizando los oligonucleótidos para ABCC5.

Una vez ajustadas las condiciones óptimas para la cuantificación relativa de cada ARNm a ser evaluado, se procedió a las cuantificaciones de los mismos.

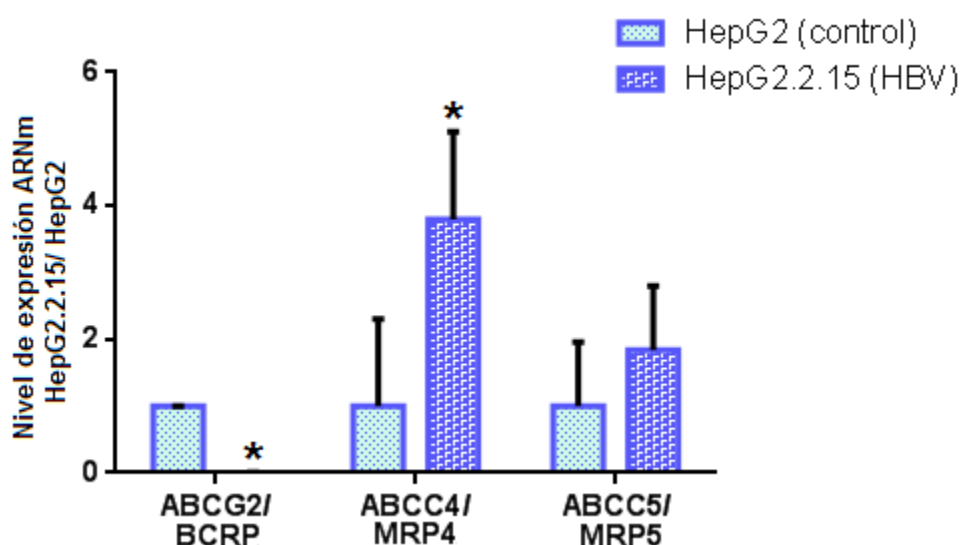


Figura R2. Niveles de expresión relativos del ARNm de ABCG2/BCRP, ABCC4/MRP4 y ABCC5/MRP5 en células HepG2.2.15, determinados por qPCR. Los resultados están relativizados utilizando la línea HepG2 como control ($n=3$, $*p<0,05$).

Tal como se observa en la figura R2, en las células HepG2.2.15 se evidencia una menor expresión a nivel ARNm del gen ABCG2/BCRP ($0,004 \pm 0,002$), así como una mayor expresión del gen ABCC4/MRP4 ($3,8 \pm 1,3$) respecto de las células HepG2, mientras que no se observan diferencias estadísticamente significativas en el ARNm de ABCC5/MRP5. Estas diferencias entre ambas líneas celulares podrían ser atribuibles a la replicación del HBV.

b. Cuantificación relativa de los niveles de proteína de transportadores ABC mediante *Western blot*

Teniendo en cuenta el resultado obtenido a nivel de ARNm, se evaluó si existía correspondencia con lo que ocurría a nivel proteico comparando ambas líneas celulares. La detección de la expresión de las proteínas BCRP y MRP4 se realizó mediante *Western blot* utilizando anticuerpos monoclonales específicos. Se relativizó dicha expresión con respecto a la de β -actina en el caso de BCRP y con respecto a GAPDH en el caso de MRP4.

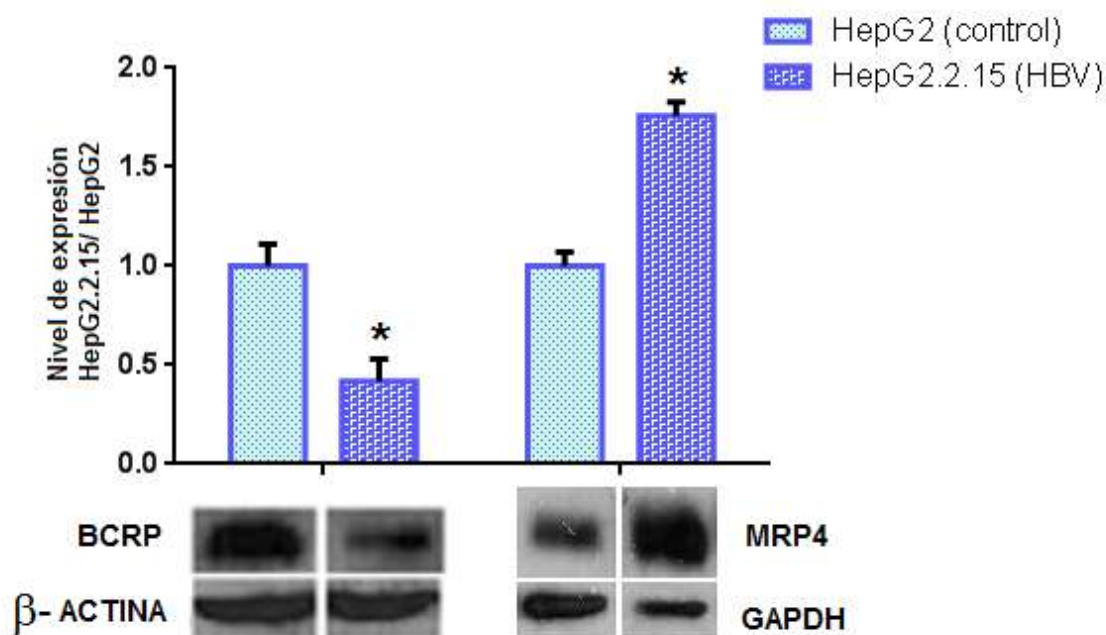


Figura R3. Niveles relativos de expresión de BCRP y MRP4 en células HepG2.2.15, determinados por Western blot; los resultados están relativizados utilizando la línea HepG2 como control. Los niveles relativos de proteína se normalizaron con β -actina y GAPDH respectivamente ($n=3$, $*p<0,05$).

Como se observa en la figura R3, se evidencia una disminución estadísticamente significativa en la expresión de BCRP ($0,4 \pm 0,1$), así como un incremento de la expresión de MRP4 ($1,76 \pm 0,07$) en las células HepG2.2.15 con respecto al control. Estos resultados coinciden con lo detectado a nivel de ARNm (figura R2).

c. Cuantificación relativa del efecto del HBV sobre la actividad de los promotores de MRP4 y BCRP

Por último, se estudió si además de afectar la expresión de MRP4 y BCRP, la actividad de los promotores de los genes correspondientes estaba también alterada en las células donde hay replicación viral respecto de las células control. Para ello se transfectaron las células HepG2.2.15 con plásmidos que tenían clonado el promotor de *ABCC4/MRP4* y *ABCG2/BCRP* río arriba del gen reportero Luciferasa. En el caso del promotor de *ABCC4/MRP4* se utilizaron dos vectores: uno con el promotor completo (2,3 Kpb) y otro con el promotor truncado (1,8 Kpb). Como control de células donde no hay replicación viral se utilizaron las células HepG2/C3A, ya que ambas líneas celulares son derivadas de la línea celular HepG2 y presentan similares eficiencias de transfección con el mismo agente de transfección. Se transfectaron células de ambas líneas celulares con una de las tres construcciones ó con plásmido control (control negativo de luminiscencia) y los resultados obtenidos se muestran en la figura R4.

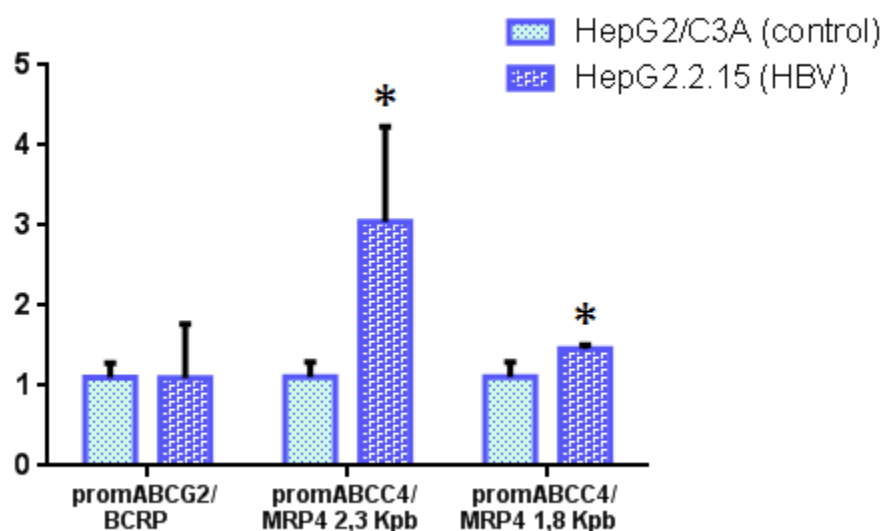


Figura R4. Niveles relativos de actividad de los promotores de BCRP y MRP4 (2,3 Kpb y 1,8 Kpb) en células HepG2.2.15, determinados mediante la detección de la expresión del gen reportero Luciferasa; los resultados están relativizados utilizando la línea HepG2/C3A como control ($n=3$, $*p<0,05$). Las diferencias entre ambos promotores de MRP4 no resultaron significativas.

De este conjunto de resultados, podemos concluir que la replicación del HBV estaría aumentando la expresión de MRP4 mediante el aumento en la actividad de su promotor ($3,05 \pm 1,18$ para el promotor completo; $1,46 \pm 0,05$

para el promotor truncado, respecto del control). Con respecto a BCRP, se observa una disminución en la expresión en presencia del HBV, aunque no se observa un efecto directo sobre el promotor de dicho gen en la línea celular HepG2.2.15.

R1. 2. Efecto de la proteína HBx sobre la expresión de transportadores ABC

a. Transfección de células hepatocitarias

La puesta a punto y medición de la eficiencia de transfección se realizó utilizando un vector que tiene clonado el gen eGFP, lo cual permitió medir la eficiencia de transfección mediante citometría de flujo.

Transcurridas 24 h post-transfección, los cultivos celulares fueron cosechados y las células fueron fijadas con una solución de paraformaldehído al 2%. El porcentaje de células transfectadas, que por lo tanto expresan la proteína GFP, fue determinado mediante citometría de flujo, tomando como eficiencia de transfección el porcentaje de células vivas con marca positiva para GFP. Se realizaron dos ensayos independientes. En la figura R5, a modo de ejemplo, se muestra el gráfico correspondiente a la citometría de flujo de la transfección de células HuH-7 transfectadas con Lipofectamina.

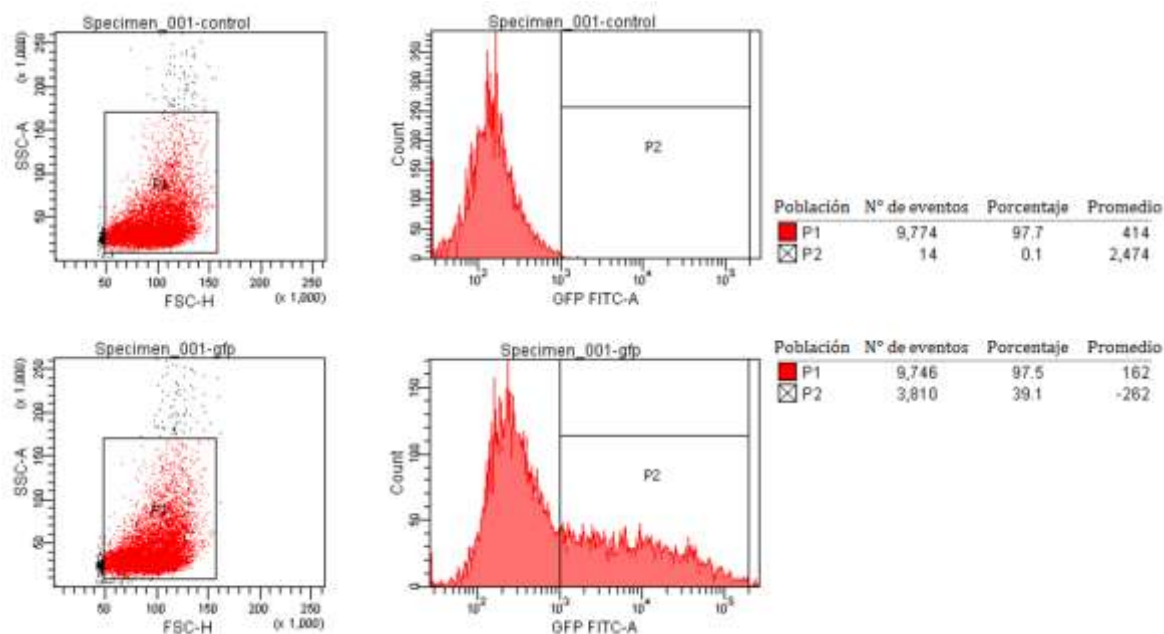


Figura R5. Determinación de la eficiencia de transfección en células HuH-7 utilizando liposomas catiónicos (Lipofectamina). Los resultados de la fila superior corresponden a las células control (tratadas solo con agente de transfección) y los

de la fila inferior a células transfectadas con el vector codificante para eGFP. En la primera columna se muestran los gráficos de granulación celular (*Side scatter*, SSC o dispersión lateral) en función del tamaño celular (*Forward scatter*, FSC o dispersión frontal). Se seleccionó la población celular a estudiar P1. En la columna central se muestran los gráficos de número de eventos medidos en función de la fluorescencia (GFP). El marcador P2 indica el porcentaje de células que emite fluorescencia (en este caso, 39,1% de las células transfectadas).

Las condiciones de transfección ensayadas se resumen en la tabla MM4, y los resultados más relevantes para cada línea celular se detallan a continuación (para protocolos ver sección MM3.b.iii):

- **HuH-7**

Se obtuvo un **35% de eficiencia** utilizando Lipofectamina como agente de transfección.

- **HepG2**

Se obtuvieron eficiencias **menores al 10%** con todas las condiciones ensayadas, por lo cual se descartó esta línea celular para todos aquellos ensayos que requirieran transfección (solo se utilizó como células control donde no hay replicación viral en los ensayos donde no fuera necesario transfectarlas).

- **HepG2/C3A**

Se obtuvo un **40% de eficiencia** utilizando XtremeGENE como agente de transfección.

- **HepG2.2.15**

Se obtuvo un **40% de eficiencia** utilizando XtremeGENE como agente de transfección.

b. Detección de la expresión de las proteínas X salvaje y mutada del HBV mediante *Western blot*

Una vez puesta a punto la técnica de transfección para cada línea celular, se transfectaron transitoriamente células HuH-7 y HepG2/C3A con los plásmidos codificantes para HBx-wt y HBx-mut. Las células fueron cosechadas 24 h post transfección, se obtuvieron los lisados proteicos correspondientes y la detección de HBx se llevó a cabo mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal anti-6xHis.

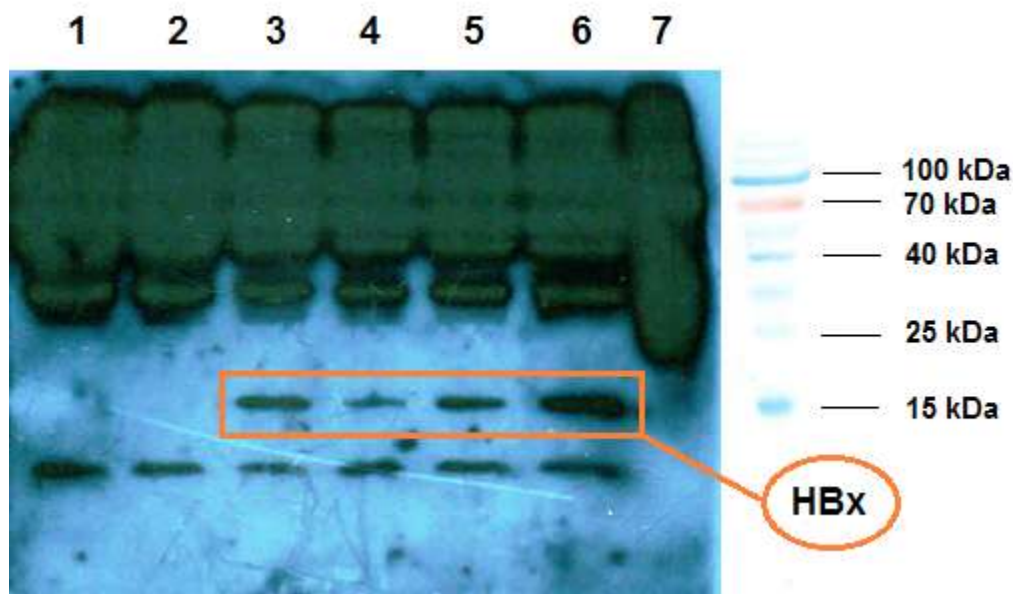


Figura R6. Western blot para HBx (detectado mediante anti-6xHis) en células HuH-7 luego de 24 h de transfección. Calles 1 y 2, células HuH-7 tratadas con agente de transfección (control); calles 3 y 4, células HuH-7 transfectadas con HBx salvaje; calles 5 y 6, células HuH-7 transfectadas con HBx mutada; calle 7, marcador de peso molecular (el anticuerpo se une inespecíficamente al marcador). A la derecha se indica el peso molecular correspondiente a las bandas más representativas del marcador. En el recuadro naranja se señala la presencia de HBx, solo en las calles correspondientes a las células transfectadas con los vectores de HBx salvaje y mutada. Esto también se corrobora con el peso molecular de dicha proteína (17 kDa).

En la figura R6 se muestran los resultados obtenidos para las células HuH-7 luego de 24 h de transfección (a las 72 h la expresión de HBx disminuye, siendo casi indetectable).

Por el contrario, para las células HepG2/C3A, a la altura donde debería detectarse la proteína HBx (17 kDa) se observa una banda inespecífica presente tanto en las células transfectadas como en el control sin transfectar. De lo expuesto se deduce que para confirmar la expresión de HBx en esta línea celular es imprescindible la utilización de un anticuerpo específico anti-HBx. Cabe mencionarse que previamente en nuestro laboratorio se probaron varios anticuerpos que teóricamente eran específicos anti-HBx, pero cuyos resultados fueron insatisfactorios en todos los casos, motivo por el cual se utiliza un anticuerpo anti-tag de histidinas (anti-6xHis). Por este motivo y debido a la imposibilidad de comprobar la expresión de HBx en esta línea celular con los anticuerpos disponibles, se decidió continuar esta parte del estudio sólo con las células HuH-7, en las cuales pudo confirmarse fehacientemente la expresión de HBx *wt* y mutada.

c. Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de transportadores ABC mediante PCR en tiempo real

Teniendo en cuenta los efectos de la replicación del HBV sobre la expresión de los transportadores ABC estudiados, se decidió evaluar la expresión de dichos transportadores en células hepatocitarias que expresaran en forma transitoria la proteína viral HBx. Se transfectaron células HuH-7 con vectores codificantes para la proteína HBx salvaje y mutada (HBx-wt y HBx-mut), y se evaluó por qPCR la abundancia relativa del ARNm de *ABCG2/BCRP*, *ABCC4/MRP4* y *ABCC5/MRP5* respecto de las células no transfectadas (control). Los resultados se muestran en las figuras R7, R8 y R9.

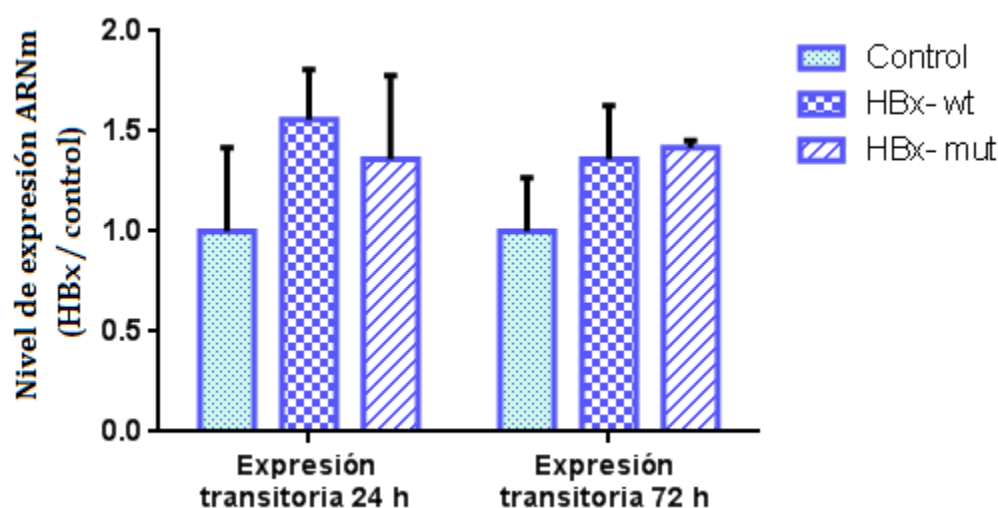


Figura R7. Niveles de expresión relativos del ARNm de *ABCG2/BCRP* determinados por qPCR en células HuH-7 transfectadas con un vector codificante para HBx-wt ó HBx-mut luego de 24 h y 72 h de transfección. Los resultados están relativizados utilizando células HuH-7 tratadas con agente de transfección como control ($n=3$). En ningún caso hubo diferencias significativas respecto del control.

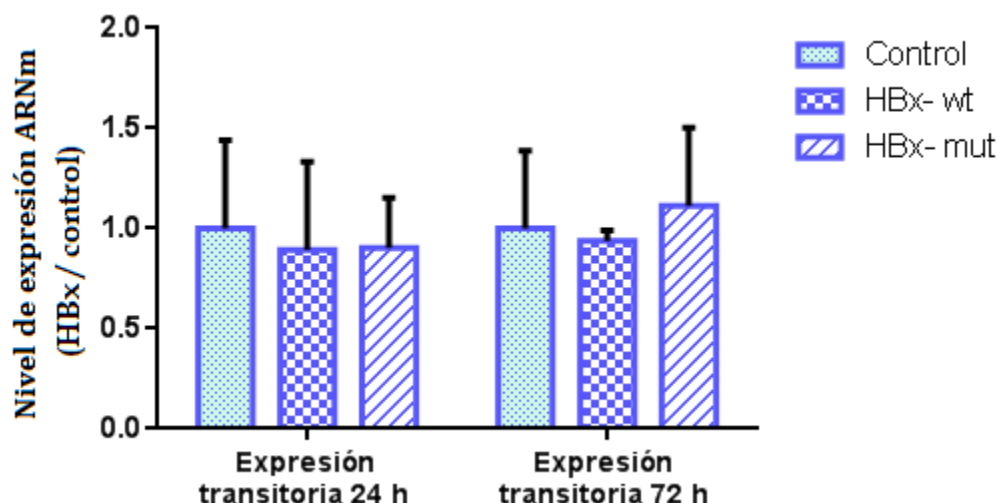


Figura R8. Niveles de expresión relativos del ARNm de ABCC4/MRP4 determinados por qPCR, en células HuH-7 transfectadas con un vector codificante para HBx-wt ó HBx-mut luego de 24 h y 72 h de transfección. Los resultados están relativizados utilizando células HuH-7 tratadas con agente de transfección como control (n=3). En ningún caso hubo diferencias significativas respecto del control.

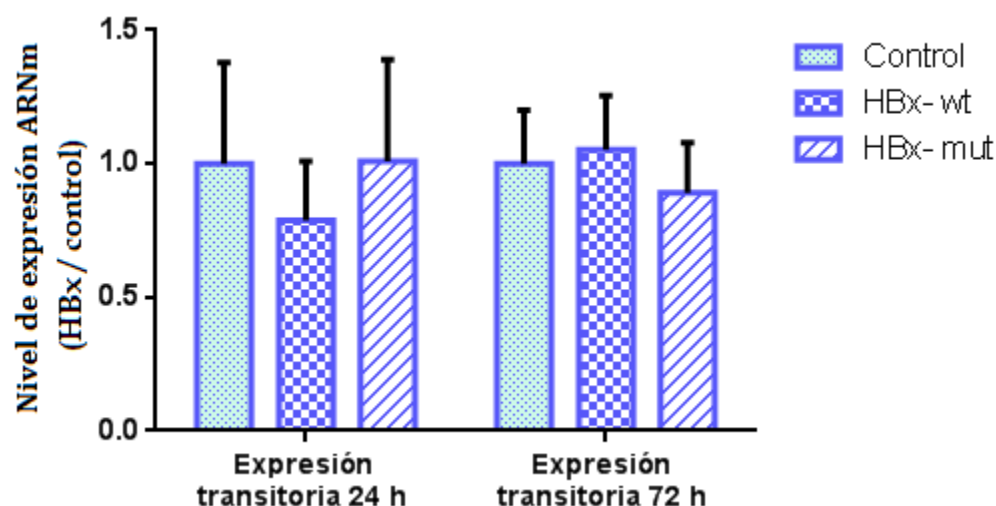


Figura R9. Niveles de expresión relativos del ARNm de ABCC5/MRP5 determinados por qPCR, en células HuH-7 transfectadas con un vector codificante para HBx-wt ó HBx-mut luego de 24 h y 72 h de transfección. Los resultados están relativizados utilizando células HuH-7 tratadas con agente de transfección como control (n=3). En ningún caso hubo diferencias significativas respecto del control.

De los resultados obtenidos, se observa que no hay una modificación estadísticamente significativa en la expresión de los ARNm estudiados en las células con expresión transitoria de HBx respecto de las células no transfectadas.

d. Cuantificación relativa de los niveles de proteína de transportadores ABC mediante *Western blot*

Si bien no hubo diferencias significativas en la expresión de los ARNm de los transportadores estudiados entre las células transfectadas y las no transfectadas, decidimos estudiar si había diferencias en las abundancias relativas de las proteínas correspondientes. Es conocido que el hecho de que no haya diferencias significativas al nivel de ARNm no necesariamente se traduce linealmente en la cantidad de la proteína correspondiente: HBx podría estar afectando factores encargados de la regulación post-traducciona l o incluso factores involucrados en la degradación proteica [Minor y Slagle, 2014]. Por este motivo, decidimos evaluar las abundancias relativas de las proteínas BCRP y MRP4 en células transfectadas transitoriamente con HBx-wt y HBx-mut mediante *Western blot*, 24 h post-transfección. Los resultados se muestran en la figura R10.

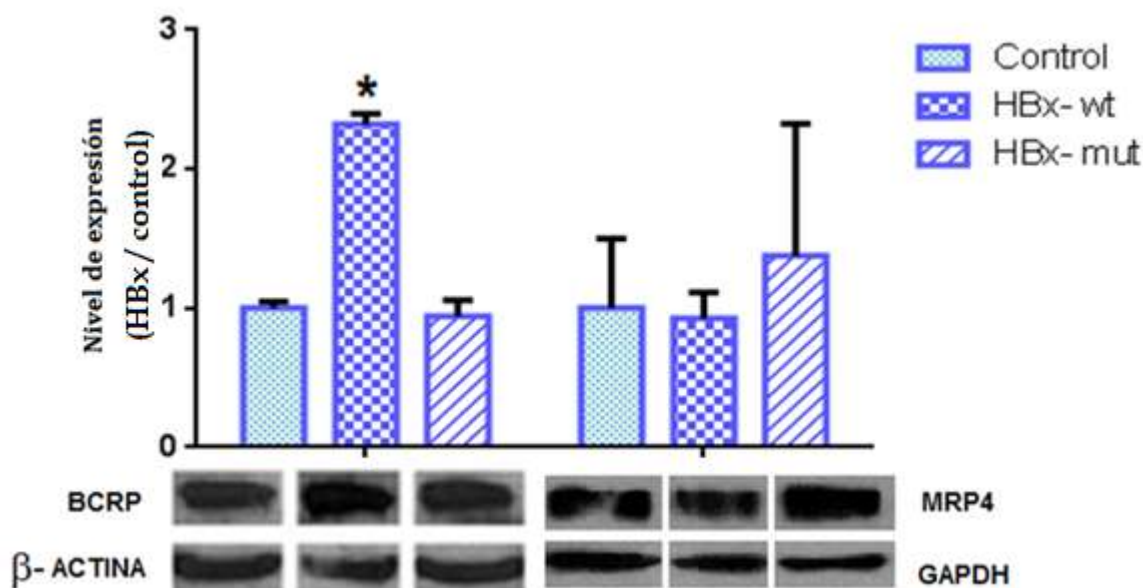


Figura R10. Niveles relativos de expresión de BCRP y MRP4, determinados mediante *Western blot*, en células HuH-7 transfectadas con un vector codificante para HBx-wt ó HBx-mut luego de 24 h de transfección. Los resultados están relativizados utilizando células HuH-7 tratadas con agente de transfección como control. Los niveles relativos de proteína se normalizaron con β -actina y GAPDH respectivamente ($n=3$, $*p<0,05$).

Como resultado, se observa un aumento estadísticamente significativo únicamente en la proteína BCRP en las células transfectadas con HBx-wt ($2,32 \pm 0,08$) respecto del control no transfectado.

e. Cuantificación relativa del efecto de la proteína HBx sobre los promotores de MRP4 y BCRP

En vista de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta que solo el 35% de las células expresan la proteína HBx pero el ARNm y los lisados proteicos son obtenidos sobre el total de las células, no podemos descartar que haya un efecto de HBx que no pueda ser detectado de manera cuantitativa debido a una “dilución” de su efecto en una mayoría de células que no expresan HBx (65%). Por este motivo, decidimos estudiar si la expresión de la proteína HBx tiene algún efecto sobre la actividad de los promotores de *ABCG2/BCRP* y *ABCC4/MRP4* (2,3 Kpb y 1,8 Kpb) mediante el gen reportero Luciferasa. La ventaja de este método es que la luminiscencia que se detecta es producto de la actividad del promotor correspondiente sólo en las células transfectadas efectivamente, por lo cual se evita este efecto de “dilución” con las células no transfectadas: es decir se cuantifica un aumento o disminución de la luminiscencia en las células que expresan HBx respecto de las células control, pero tanto en los tratamientos (HBx salvaje y mutada) como en el control se registra luminiscencia debido a la presencia del gen reportero.

Si bien el ensayo se realizó tanto para la línea celular HuH-7 como HepG2/C3A, sólo en las células HepG2/C3A se alcanzaron niveles de luminiscencia satisfactorios (al menos dos veces superiores al nivel de luminiscencia de células no transfectadas), por lo cual los resultados obtenidos con las células HuH-7 no fueron tenidos en cuenta. Los resultados obtenidos con la línea celular HepG2/C3A se muestran en las figuras R11 y R12.

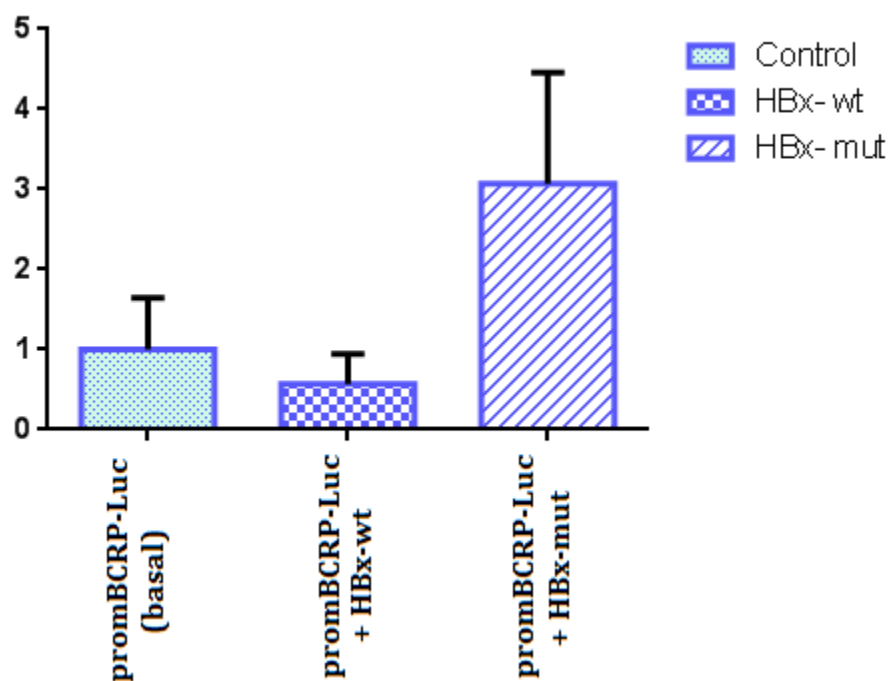


Figura R11. Niveles relativos de actividad del promotor de ABCG2/BCRP en células HepG2/C3A transfectadas con un vector codificante para HBx-wt ó HBx-mut luego de 48 h de transfección, determinados mediante la detección de la expresión del gen reportero Luciferasa; los resultados están relativizados a la actividad de dicho promotor en células transfectadas con la misma construcción, donde el vector codificante para HBx fue reemplazado por un vector no codificante, indicado como basal (n=3). En ningún caso hubo diferencias significativas respecto del control.

En la figura R11 se observa que, al menos en las células HepG2/C3A, la proteína HBx no afecta la actividad del promotor de ABCG2/BCRP. Esto es consistente con los resultados obtenidos en la línea celular HepG2.2.15 (figura R4), donde se observa que la actividad de dicho promotor no se encuentra afectada por la replicación viral. Si bien no es correcto comparar directamente estos resultados con los obtenidos de la transfección de HBx en células HuH-7 (donde se observa que el nivel de ARNm de BCRP no difiere significativamente del control, pero sí hay un aumento en el nivel de proteína, ver figuras R7 y R10), tomados en conjunto estos resultados podrían indicar que la proteína HBx no estaría actuando en la regulación de este gen afectando directamente la actividad del promotor, pero sí podría tener algún efecto a nivel traduccional o post-traduccional.

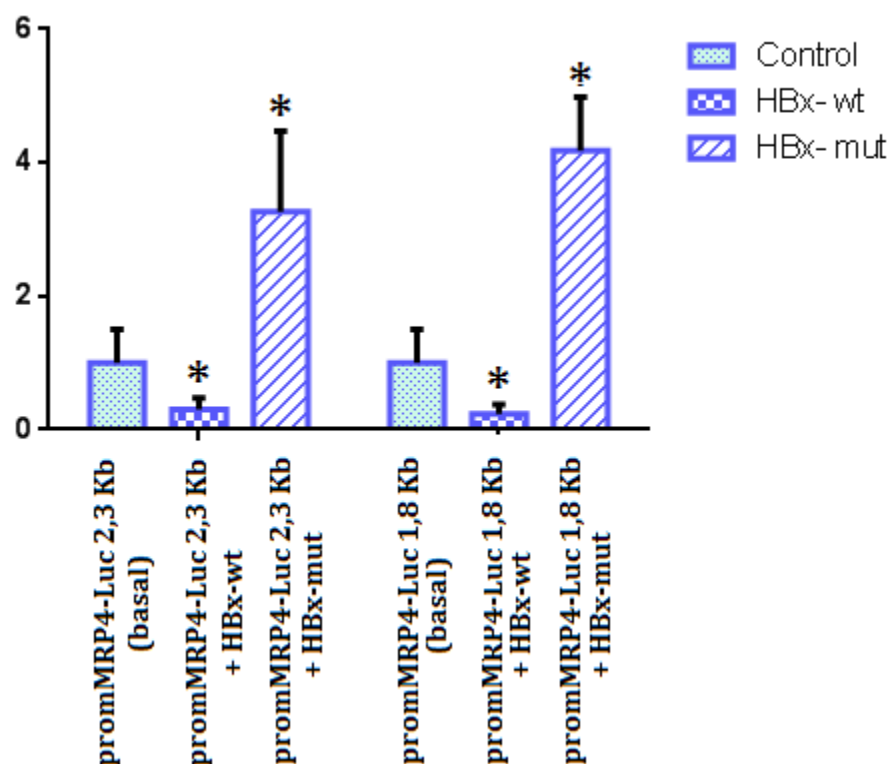


Figura R12. Niveles relativos de actividad del promotor de ABCC4/MRP4 (2,3 Kb ó 1,8 Kb) en células HepG2/C3A transfectadas con un vector codificante para HBx-

wt ó *HBx-mut* luego de 48 h de transfección, determinados mediante la detección de la expresión del gen reportero *Luciferasa*; los resultados están relativizados a la actividad del promotor correspondiente en células transfectadas con la misma construcción, donde el vector codificante para *HBx* fue reemplazado por un vector no codificante, indicado como basal ($n=3$, $*p<0,05$).

En la figura R12, tanto para el promotor de 2,3 Kb como el de 1,8 Kb del gen *ABCC4/MRP4* se observa el mismo patrón: una disminución de la actividad en presencia de *HBx-wt* ($0,3 \pm 0,2$ y $0,2 \pm 0,1$, respectivamente) y un aumento de la actividad con *HBx-mut* ($3,3 \pm 1,2$ y $4,2 \pm 0,8$, respectivamente) respecto del control sin *HBx*, documentándose por primera vez en este estudio efectos opuestos de ambas *HBx* sobre la expresión de transportadores ABC (hasta ahora se había registrado que ambas producían el mismo efecto, o que una tenía algún efecto estadísticamente significativo mientras que la otra no). Esto podría estar indicando que las mutaciones permiten (o impiden) la interacción de *HBx* con algún factor de transcripción (o inhibidor) en forma diferencial respecto de lo que ocurre con *HBx* salvaje.

Por otro lado, tal como se observa en la figura R4, para ambos segmentos de dicho promotor se registró un aumento en su actividad en presencia de HBV. No se puede descartar que las diferencias entre ambos sistemas sean causadas por otras proteínas virales que también actúen modulando la expresión de *MRP4*, o que esta diferencia se deba a las diferencias entre *HBx* en HBV genotipo D (células HepG2.2.15) y *HBx* en HBV genotipo F. El análisis de estas posibilidades se retomará en la discusión.

R1. 3. Efecto del HBV sobre la vía de señalización de las MAPK y su regulador negativo MKP-1

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, que evidencian la capacidad del virus HBV y particularmente de la proteína *HBx* para regular la expresión de los transportadores ABC estudiados, se decidió estudiar algunas de las posibles vías de regulación que podrían estar afectadas. Es por eso que se decidió analizar algunos de los factores involucrados en la vía de señalización de las MAPK.

a. Estudio del efecto de la expresión de la proteína X sobre la fosforilación de ERK1/2

Se transfectaron células HuH-7 con el vector codificante para *HBx-wt* ó *HBx-mut* y 24 h post-transfección se evaluó el estado de fosforilación de ERK1/2 mediante *Western blot* (anti- P-ERK1/2). Para ello se relativizaron los resultados sobre la cantidad total de ERK1/2. Los resultados se muestran en la figura R13.

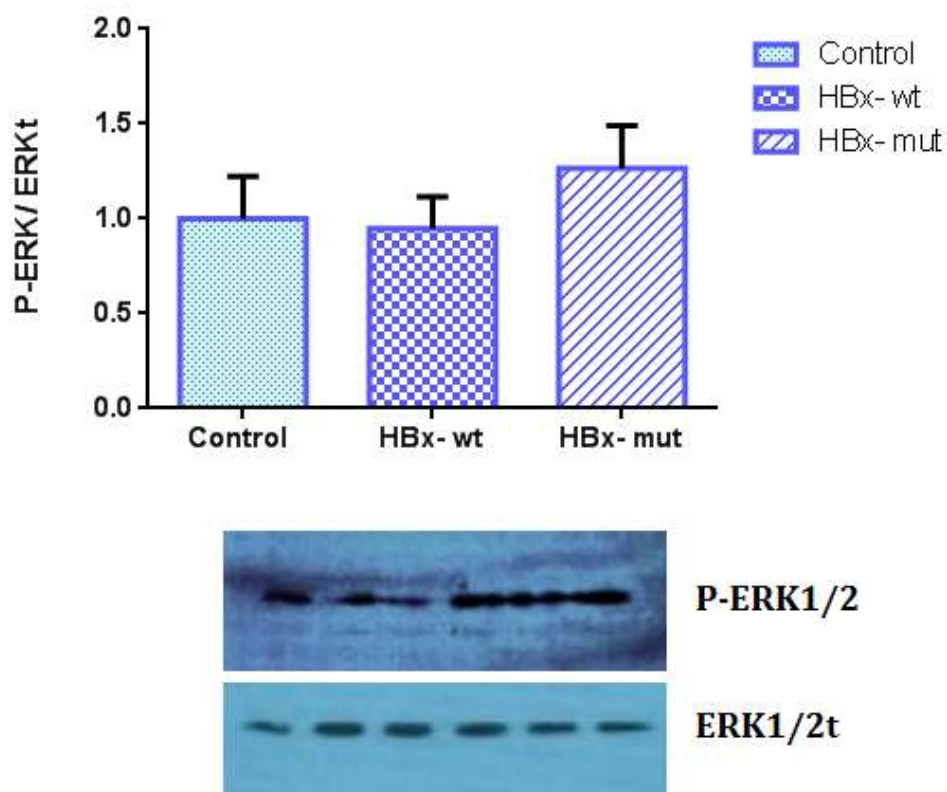


Figura R13. Niveles relativos de fosforilación de ERK1/2, determinados mediante Western blot, en células HuH-7 transfectadas con un vector codificante para HBx-wt ó HBx-mut luego de 24 h de transfección. Los resultados están relativizados utilizando células HuH-7 tratadas con agente de transfección como control. Los niveles relativos de fosforilación se graficaron calculando la relación entre P-ERK1/2 y ERK1/2 total en cada calle ($n=3$). No se documentaron diferencias estadísticamente significativas.

Estos resultados estarían indicando que, al menos 24 h post transfección, no hay diferencias en la fosforilación de ERK1/2 entre las células que expresan HBx y las que no. Sin embargo, dado que dicha fosforilación es reversible y variable en el tiempo, si bien este resultado indicaría que no está alterada la fosforilación de ERK1/2, no se puede descartar su participación (en forma directa o indirecta) en la alteración de la expresión de los transportadores ABC estudiados mediada por HBx.

b. Estudio del efecto de la replicación del HBV y de la expresión de la proteína X sobre la expresión del ARNm de MKP-1

Siguiendo con la misma línea de estudio del mecanismo por el cual el HBV podría estar afectando la expresión de los transportadores ABC, se estudió de manera semi-cuantitativa la expresión del ARNm de MKP-1 mediante RT-PCR multiplex.

En primer lugar, se evaluó la expresión de MKP-1 en las células HepG2.2.15 y si había diferencias respecto a las células HepG2 y HepG2/C3A. Se utilizó el ARNm de β -actina para relativizar la expresión de MKP-1.

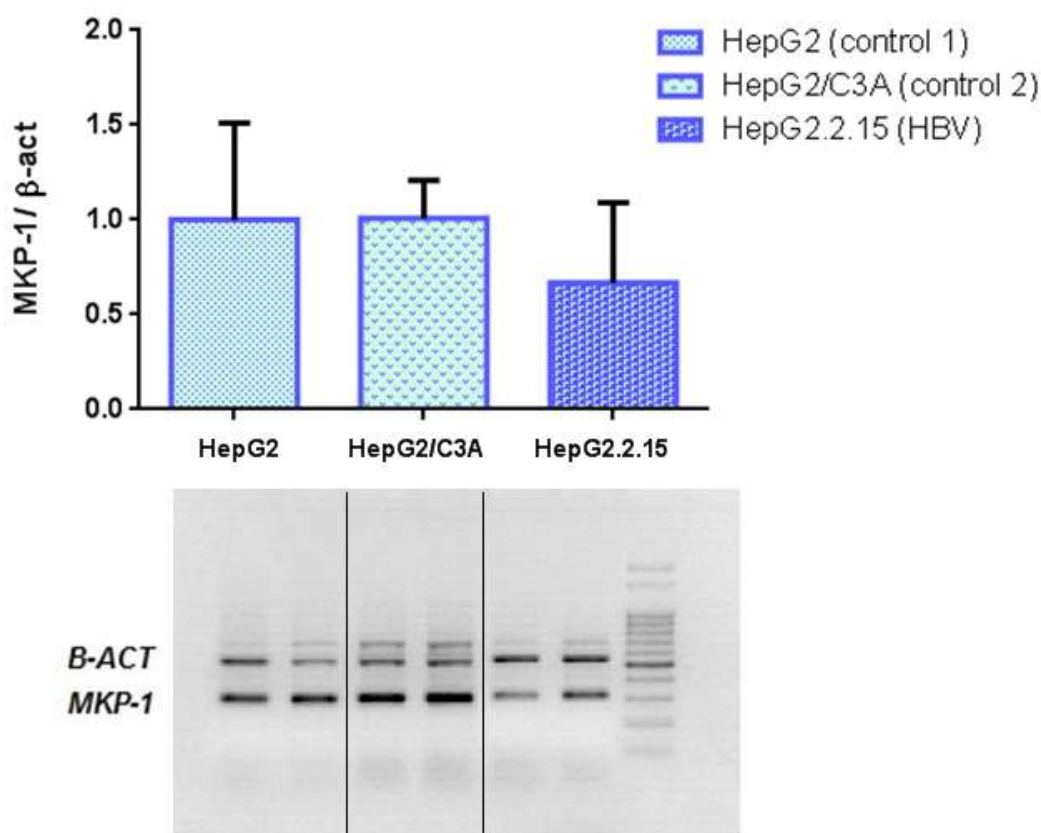


Figura R14. Niveles relativos de expresión del ARNm de MKP-1, determinados mediante RT-PCR multiplex, en células HepG2.2.15. Los resultados están relativizados a la expresión de MKP-1 en células HepG2 y HepG2/C3A (controles). Los niveles relativos de expresión se graficaron calculando la relación entre MKP-1 y β -actina en cada calle. Se muestran dos calles de cada línea celular y a la derecha el marcador de peso molecular de 100 pb, donde la banda más intensa corresponde a 500 pb. No se documentaron diferencias estadísticamente significativas entre HepG2.2.15 y las células control ($n=4$).

Tal como se observa en la figura R14, los niveles del ARNm MKP-1 son similares en HepG2 y HepG2/C3A; si bien se observa que la media de la expresión de dicho ARNm en las células HepG2.2.15 es menor a ambos controles, dicha diferencia no resultó estadísticamente significativa.

Si bien no se observaron diferencias en la expresión de MKP-1 atribuibles a la replicación viral, se decidió estudiar si la proteína HBx podría tener algún efecto sobre la expresión de dicho ARNm en células HuH-7. Se estudió la expresión del ARNm de MKP-1 en células HuH-7 luego de 24 h y 72 h de transfección.

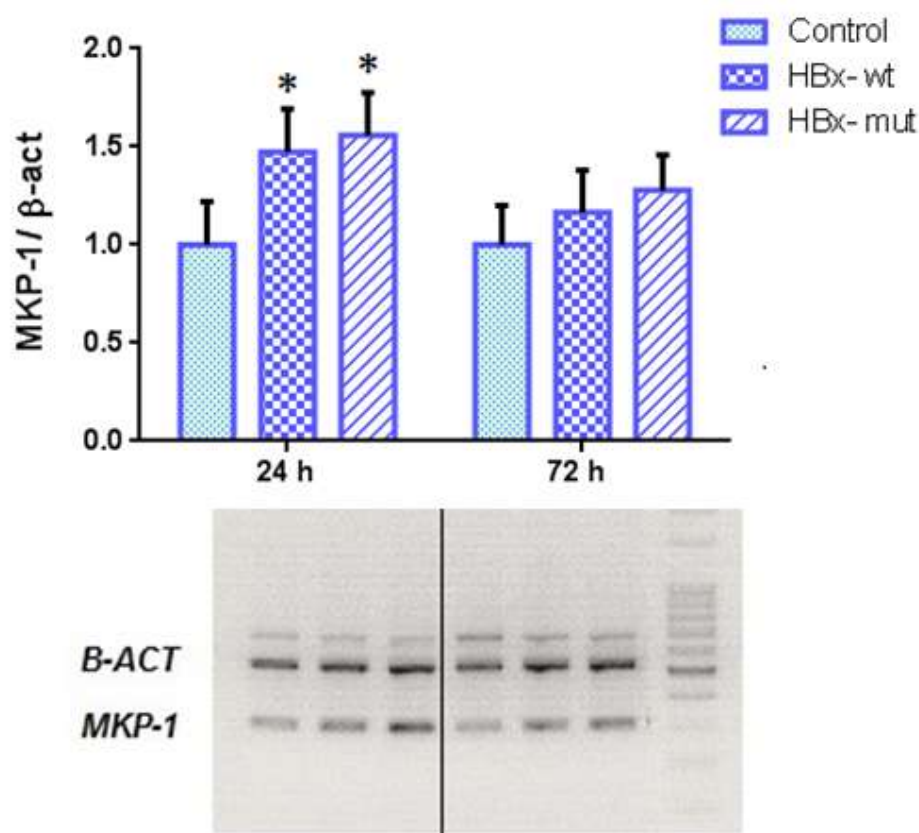


Figura R15. Niveles relativos de expresión del ARNm de MKP-1, determinados mediante RT-PCR multiplex, en células HuH-7 transfectadas con un vector codificante para HBx-wt ó HBx-mut luego de 24 h y 72 h de transfección. Los resultados están relativizados utilizando células HuH-7 tratadas con agente de transfección como control. Los niveles relativos de expresión se graficaron calculando la relación entre MKP-1 y β -actina en cada calle. Se muestra una calle de cada tratamiento a 24 h y 72 h, y a la derecha el marcador de peso molecular de 100 pb, donde la banda más intensa corresponde a 500 pb ($n=4$, $*p<0,05$).

La figura R15 muestra un aumento estadísticamente significativo en las células transfectadas con HBx-wt ($1,5 \pm 0,2$), así como con HBx-mut ($1,6 \pm 0,2$) respecto de las células no transfectadas con HBx, pero solo 24 h post-transfección, mientras que dicho efecto se pierde a las 72 h.

En conjunto, estos resultados muestran que HBx estimula la expresión de MKP-1: si bien la fosforilación de ERK1/2 no está afectada, si podría estarlo la fosforilación de otras MAPK involucradas en esta vía, y estas podrían afectar la expresión de diversas proteínas, entre ellas proteínas de la familia ABC. El análisis de estas posibilidades se retomará en la discusión.

CAPÍTULO 2

DESARROLLO DE ESTRATEGIAS TECNOLÓGICAS TENDIENTES A OPTIMIZAR LA TERAPÉUTICA CONTRA EL HBV

R2. 1. Estudio del efecto de diferentes análogos de nucleósidos desarrollados en nuestro país en el contexto de un sistema *in vitro* de replicación del HBV

Se evaluó la actividad antiviral de 4 análogos nucleosídicos (ANs) obtenidos mediante síntesis química a partir del 2-amino-1-indanol (ver sección MM2.b). Previamente se determinó la citotoxicidad de dichos compuestos en la línea celular en la cual se realizó el ensayo (HepG2.2.15), mediante el método de MTS/PMS. En base a estos resultados, se incubaron las células con la mayor de las concentraciones ensayadas no citotóxicas: 100 μ M para los compuestos **1**, **2** y **3**, y 25 μ M para el compuesto **4**. Se realizaron recambios de medio cada 48 h y se recolectaron los sobrenadantes a los 7 días de comenzado el experimento. Como se trataba de una aproximación inicial, el experimento se llevó a cabo por duplicado y como medida de actividad antiviral sólo se midió el título de HBsAg y HBeAg, no así la carga viral. Los resultados se muestran en la tabla R1.

Tabla R1. Porcentaje respecto del control no tratado de HBsAg y HBeAg, para cada uno de los compuestos ensayados, en el sobrenadante de células HepG2.2.15 luego de 7 días de tratamiento ($n=2$).

Compuesto	% HBsAg	%HBeAg
Aza-OH (1) 100 μ M	95 $\pm$ 8	98 $\pm$ 5
Aza-NH (2) 100 μ M	95 $\pm$ 11	94 $\pm$ 7
Derivado de triazol (3) 100 μ M	93 $\pm$ 7	106 $\pm$ 8
Derivado de purina (4) 25 μ M	40 $\pm$ 7	27 $\pm$ 1

Como se observa en la tabla R1, de los 4 compuestos ensayados sólo el compuesto **4** (derivado de purina: 9-(1-hidroxi-Indan-2-il)-6-cloro-purina) presentó actividad antiviral, con una disminución del 60% del HBsAg y 73% del HBeAg respecto del control. Por este motivo, se midió la carga viral de HBV en el sobrenadante de las células tratadas con este compuesto (**45,6 $\pm$ 0,8%** respecto del control) y fue el único de los ANs ensayados que se continuó estudiando (ver secciones R2.3 y R2.4).

R2.2. Estudio de la acción de co-polímeros lineales y ramificados de PEO-PPO sobre la expresión de transportadores ABC (parte de los resultados publicados en Cuestas *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22 (2012) 6577–6579)

Teniendo en cuenta el destacado rol de los transportadores de la familia ABC en la resistencia a la terapéutica antiviral, nos interesaba encontrar compuestos que permitieran modular la actividad de los mismos de manera de mejorar la eficacia del tratamiento con ANs. Es por ello que, teniendo en cuenta la bibliografía que da cuenta de su potencial como moduladores de la actividad de algunas bombas de membrana y que son compuestos utilizados en la formulación de diversos fármacos, por lo cual se encuentran aprobados por la FDA, se decidió evaluar el efecto de algunos co-polímeros lineales y ramificados de PEO-PPO (poloxaminas y poloxámeros) sobre la expresión del ARNm de algunos de los transportadores ABC más representativos.

En primer lugar, se evaluó la citotoxicidad de las poloxaminas Tetronic® T304, T904, T1107 y T1301 y el poloxámero Pluronic® F127 (concentraciones 0,01%, 0,1% y 1%) sobre las líneas celulares HuH-7 y HepG2.2.15 mediante el método MTS/PMS. Una vez determinadas las concentraciones citocompatibles de poloxámero y poloxaminas para cada línea celular, se procedió a evaluar el efecto de la incubación con los compuestos (en las concentraciones citocompatibles para cada una, ver sección MM4.b.ii) durante 72 h sobre la expresión del ARNm de *ABCB1/MDR1*, *ABCC1/MRP1* y *ABCG2/BCRP* en HuH-7 y de *ABCB1/MDR1*, *ABCC1/MRP1*, *ABCG2/BCRP*, *ABCC4/MRP4* y *ABCC5/MRP5* en HepG2.2.15, mediante RT-qPCR. A continuación se muestran los resultados obtenidos en las figuras R16 y R17.

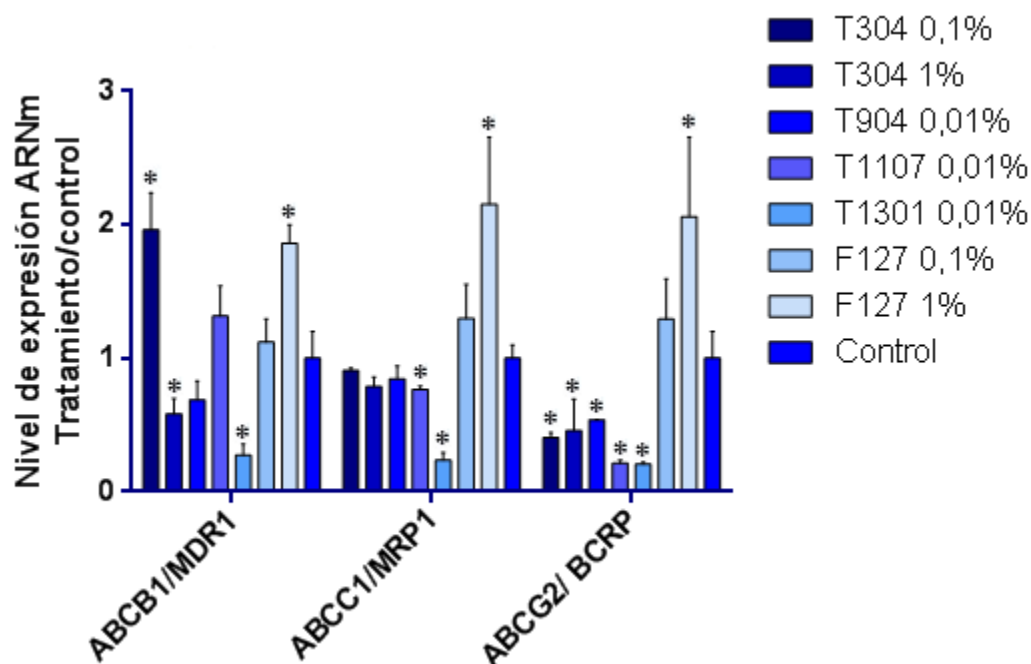


Figura R16. Niveles de expresión relativos del ARNm de ABCB1/MDR1, ABCC1/MRP1 y ABCG2/BCRP determinados por qPCR, en células HuH-7 incubadas por 72h con los co-polímeros T304 (0,1 y 1%), T904 (0,01%), T1107 (0,01%), T1301 (0,01%) y F127 (0,1 y 1%). Los resultados están relativizados a células HuH-7 incubadas durante 72 h con medio de cultivo 10% SFB (control; n=3, * $p < 0,05$).

En función de estos primeros resultados, consideramos que los co-polímeros más apropiados para continuar con los ensayos en la línea HepG2.2.15 eran aquellos capaces de afectar negativamente la expresión de los transportadores ABC estudiados, o que al menos no afectaran significativamente dicha expresión en HuH-7: T304 1%, T904 0,01%, T1107 0,01%, T1301 0,01% y F127 0,1%. Sin embargo, y teniendo en cuenta que algunos de los co-polímeros con un efecto modulador negativo más marcado, como el T1107 y el T1301 resultaron citotóxicos en HepG2.2.15, decidimos evaluar el efecto de todos los co-polímeros que hubieron resultado compatibles en las concentraciones ensayadas en esta línea celular.

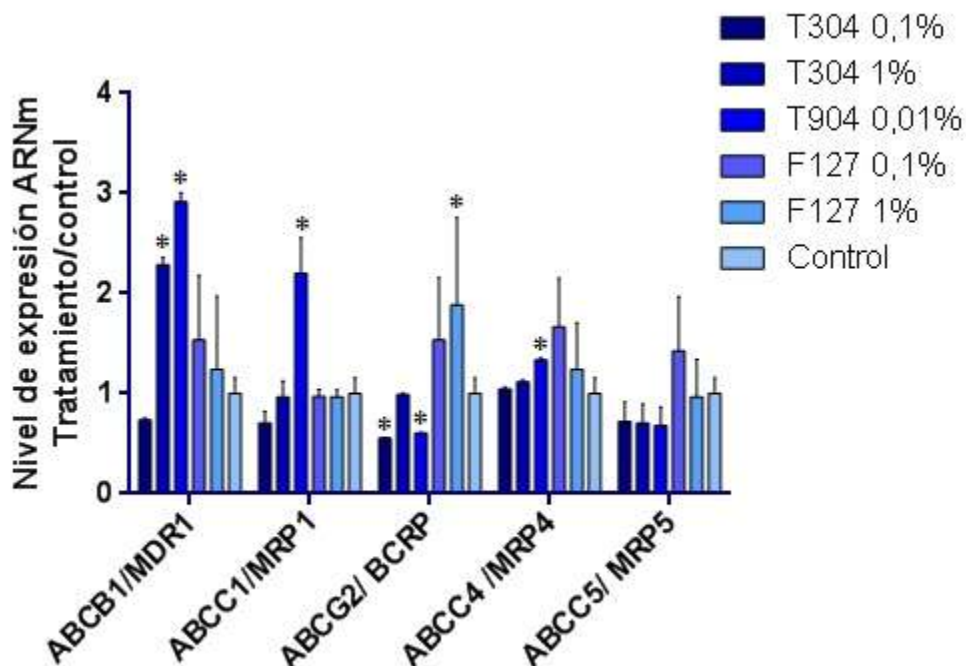


Figura R17. Niveles de expresión relativos del ARNm de ABCB1/MDR1, ABCC1/MRP1, ABCG2/BCRP, ABCC4/MRP4 y ABCC5/MRP5 determinados por qPCR, en células HepG2.2.15 incubadas por 72h con los co-polímeros T304 (0,1 y 1%), T904 (0,01%) y F127 (0,1 y 1%). Los resultados están relativizados a células HepG2.2.15 incubadas durante 72 h con medio de cultivo 10% SFB (control; n=3, * $p < 0,05$).

Como se observa en la figura R17, los únicos co-polímeros que disminuyeron significativamente el ARNm de alguna de las bombas en las células HepG2.2.15 fueron T304 al 0,1% y T904 al 0,01%, disminuyendo ambos la expresión del ARNm de ABCG2/BCRP, pero T904 aumentó la expresión de ABCB1/MDR1, ABCC1/MRP1 y ABCC4/MRP4, por lo cual fue desestimado en los siguientes ensayos. El resto de los compuestos, aumentaba la expresión de al menos uno de los ARNm estudiados, excepto el F127 al 0,1% que no afectó significativamente la expresión de ninguno de ellos.

Por este motivo, en la etapa siguiente se continuaron estudiando sólo los co-polímeros T304 y F127, ambos al 0,1%.

R2. 3. Diseño de formulaciones droga- co-polímero y estudio de su efecto *in vitro* sobre la replicación del HBV

En función de los resultados anteriores, se seleccionó el AN que presentó mayor actividad antiviral (derivado de purina: compuesto **4**) para combinar con algún co-polímero que haya presentado baja citotoxicidad y en una concentración en la cual no modulara o modulara negativamente la expresión de los transportadores ABC estudiados.

Fue así como en primer lugar se evaluó la actividad antiviral intrínseca de los co-polímeros T304 y F127 al 0,1% para determinar cuál resultaba más apropiado para combinar con el AN seleccionado. Luego de 7 días de incubación de células HepG2.2.15 con dichos co-polímeros, se determinó el título de HBsAg, HBeAg y carga viral de HBV en el sobrenadante. Los resultados se muestran en la tabla R2.

Tabla R2. Porcentaje respecto del control no tratado de HBsAg, HBeAg y carga viral para cada uno de los co-polímeros ensayados, en el sobrenadante de células HepG2.2.15 luego de 7 días de tratamiento (n=2).

Co-polímero	% HBsAg	%HBeAg	% CV
T304 0,1%	104 ± 20	72 ± 4	89 ± 3
F127 0,1%	19 ± 1	17 ± 2	67 ± 1

En función de estos resultados (y además, teniendo en cuenta la capacidad del T304 0,1% de aumentar la expresión de *ABCB1/MDR1* en HuH-7, figura R16, lo cual es un efecto contrario al deseado) se seleccionó el co-polímero F127 al 0,1% para combinar con el AN seleccionado y realizar los ensayos de actividad antiviral correspondientes. Se midió HBsAg, HBeAg y carga viral de HBV en el sobrenadante luego de 7 y 10 días de incubación con el AN (compuesto **4**) 25 µM, el co-polímero F127 0,1%, y con la combinación de AN y co-polímero. Los resultados se muestran en la figura R18 y la tabla R3 (en la tabla se muestran sólo los resultados obtenidos luego de 10 días de incubación, la medición a los 7 días arrojó resultados equivalentes).

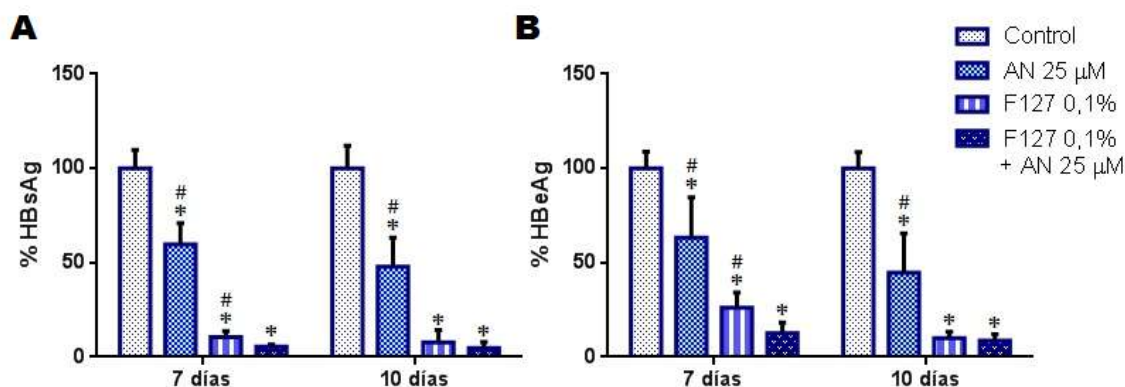


Figura R18. Porcentaje respecto del control no tratado de HBsAg (**A**) y HBeAg (**B**) en el sobrenadante de células HepG2.2.15 tratadas con el AN derivado de purina (compuesto **4**) 25 μ M, el poloxámero F127 al 0,1% y la combinación de ambos compuestos luego de 7 y 10 días de tratamiento ($n=6$, $*p<0,05$ para cada tratamiento respecto del control, $^{\#}p<0,05$ para el tratamiento con el AN ó el poloxámero respecto de la combinación de ambos).

Tabla R3. Porcentaje respecto del control no tratado de carga viral de HBV en el sobrenadante de células HepG2.2.15 tratadas con el AN derivado de purina (compuesto **4**) 25 μ M, el poloxámero F127 al 0,1% y la combinación de ambos compuestos luego de 10 días de tratamiento ($n=2$).

Tratamiento	% CV
AN 25 μ M	42 $\pm$ 2
F127 0,1%	49 $\pm$ 4
AN 25 μ M + F127 0,1%	31 $\pm$ 2

Se observa una disminución significativa en la detección de antígenos virales en el sobrenadante no sólo con la incubación con el AN ó con el poloxámero, sino que también es significativa dicha disminución cuando se comparan las células tratadas con la combinación de ambos compuestos respecto de la incubación con uno u otro compuesto por separado. Estos resultados evidencian no sólo la capacidad antiviral intrínseca del AN y el co-polímero seleccionados, sino que la combinación de ambos compuestos potencia el efecto que estos tienen por separado, demostrando un efecto sinérgico en su actividad antiviral (figura R18). Esta tendencia también se observa en la disminución de la carga viral de HBV en el sobrenadante (tabla R3).

R2. 4. Estudio del efecto *in vitro* de las formulaciones droga-co-polímero sobre la expresión del ARNm de los transportadores ABC

Finalmente, además de analizar la actividad antiviral en el sobrenadante, al finalizar el experimento se recuperaron las células (incubadas durante 10 días con el AN, el poloxámero y la combinación de ambos) y se estudió el efecto de dicha incubación sobre la expresión del ARNm de los transportadores ABC. Los resultados obtenidos se muestran en la figura R19.

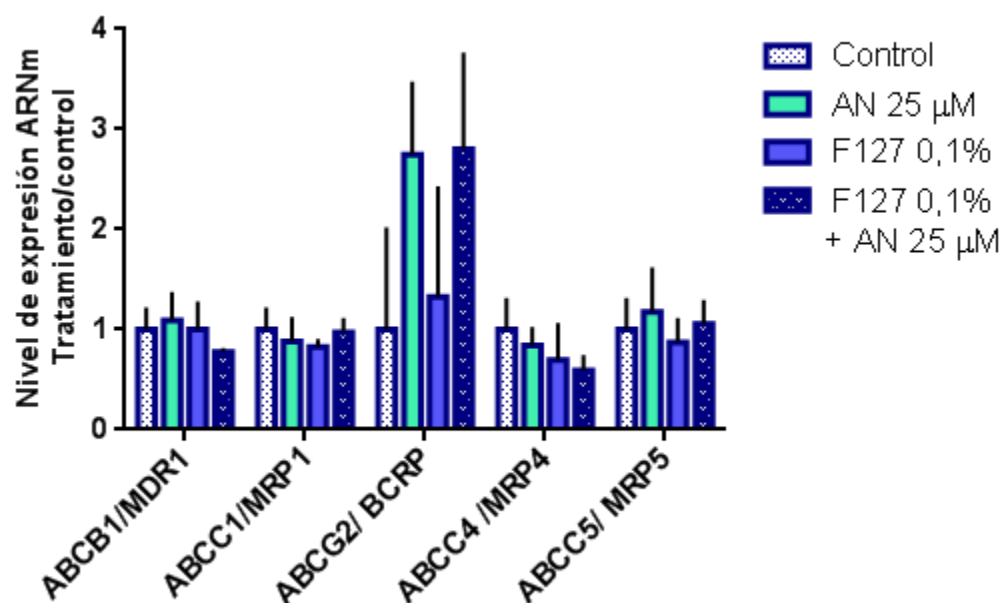


Figura R19. Niveles de expresión relativos del ARNm de ABCB1/MDR1, ABCC1/MRP1, ABCG2/BCRP, ABCC4/MRP4 y ABCC5/MRP5 determinados por qPCR, en células HepG2.2.15 incubadas con el AN derivado de purina (compuesto 4) 25 μ M, el poloxámero F127 al 0,1% y la combinación de ambos compuestos luego de 10 días de tratamiento. Los resultados están relativizados a células HepG2.2.15 incubadas durante 10 días con medio de cultivo 10% SFB (control). No se documentaron diferencias estadísticamente significativas entre las células tratadas y el control no tratado ($n=3$).

Los resultados obtenidos indican que tanto los compuestos seleccionados (AN y poloxámero) como su combinación resultan inertes respecto a la expresión del ARNm de los transportadores estudiados (ABCB1/MDR1, ABCC1/MRP1, ABCG2/BCRP, ABCC4/MRP4 y ABCC5/MRP5) en esta línea celular luego de 10 días de tratamiento. Estos resultados son consistentes con lo observado cuando se incubó con F127 al 0,1% durante 72 h (figura R17).

Conjuntamente, estos resultados confirman que la incorporación de F127 al tratamiento con ANs en la terapéutica anti-HBV constituye una opción que merece ser evaluada, dado que este compuesto no solo presenta actividad antiviral intrínseca, sino que su combinación con un AN potenció el efecto antiviral del mismo sin afectar de manera indeseada la expresión de los ARNm de los transportadores ABC estudiados. Esto permitiría reducir la dosis necesaria de ANs para que sea efectiva, disminuyendo así no sólo el costo del tratamiento sino sus posibles efectos adversos.

CAPÍTULO 3

ANÁLISIS DEL PERFIL DE RESISTENCIA A DROGAS ANTIVIRALES EN PACIENTES CRÓNICAMENTE INFECTADOS CON HBV

Con el objetivo de estudiar en pacientes crónicamente infectados con HBV la presencia de características del virus y del paciente que pudieran favorecer la aparición de resistencia a la terapéutica antiviral, se estudiaron tanto mutaciones presentes en el genoma viral a partir de ADN aislado del suero del paciente, así como polimorfismos en el gen *ABCC4* a partir de ADN aislado de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

R3. 1. Estudio de mutaciones en el dominio de Transcriptasa Inversa (TI) del gen *pol* del HBV asociadas a la resistencia a drogas antivirales

Se recibieron muestras de pacientes monoinfectados con HBV, de manera crónica, provenientes del Hospital General de Agudos “Dr. Cosme Argerich”. Dichas muestras ya habían sido analizadas en busca de los marcadores virales para HAV, HCV y HIV, de manera de descartar otras infecciones.

En primer lugar, se extrajo el ADN sérico de todas las muestras y se amplificó un fragmento del gen de la polimerasa viral mediante PCR, de acuerdo a la técnica descrita en la sección MM5.a.ii, combinando tres pares de *primers*. Sin embargo, pese a la utilización de distintos pares de *primers* y combinación de los mismos en *Nested-PCR*, en algunas muestras no fue posible la amplificación de dicho fragmento. Cabe destacar que en la mayoría de los casos se trataba de muestras de pacientes tratados con antivirales, por lo cual presentaban baja carga viral.

En aquellas muestras en las que la reacción de PCR fue positiva con alguno de los pares de *primers* utilizados, el producto de amplificación fue secuenciado y analizado en busca de mutaciones que en la bibliografía están reportadas por producir resistencia a alguno(s) de los antivirales que se utilizan en la terapéutica contra el HBV. Estos resultados se muestran en las tablas R4 y R5 junto con datos de marcadores virales y carga viral (aportados por el Servicio de Hepatología del Hospital Argerich), así como el genotipo y subgenotipo viral determinado para cada muestra (ver figura R20). Otros datos de la historia clínica de cada paciente se muestran en el Apéndice de este capítulo (tabla R7).

Tabla R4. Perfil virológico de cada muestra estudiada. Los datos de marcadores virales positivos y carga viral fueron proporcionados por el Servicio de Hepatología del Hospital Argerich.

Paciente	Marcadores virales +	Carga viral (UI/ml)
LR1	HBsAg HBeAg	SD
RB2	HBsAg HBeAg	SD
LC3	HBsAg Anti-HBsAg Anti-HBcAg	SD
FC4	HBsAg	729
MB5	HBsAg Anti-HBcAg	92
FI6	HBsAg Anti-HBcAg Anti-HBeAg	50900
AL7	HBsAg	22400
BA8	HBsAg Anti-HBcAg Anti-HBeAg	38000
AC9	HBsAg Anti-HBcAg	SD
JG10	HBsAg HBeAg	11000000
NA11	HBsAg HBeAg Anti-HBcAg	257
XK13	HBsAg HBeAg Anti-HBcAg	2520000
CD15	HBsAg Anti-HBeAg	SD
CA16	HBsAg Anti-HBcAg Anti-HBeAg	52500
HS17	HBsAg HBeAg Anti-HBcAg	2300000

SD: sin datos.

Tabla R5. Resultados de PCR y secuenciación obtenidos en cada caso, así como las mutaciones encontradas reportadas en la bibliografía como asociadas a resistencia al tratamiento con antivirales. Entre paréntesis se indica el antiviral al cual se asocia falla en la terapéutica para cada mutación (ADV: adefovir dipivoxil, ETV: entecavir, LdT: telvibudina, LMV: lamivudina).

Paciente	PCR	Genotipo	Subgenotipo	Mutaciones asociadas a resistencia
LR1	+	D	D1	Y221F (ADV)
RB2	-			
LC3	+	D	D6	L164M (LMV) S202C (ETV) M204I (LdT) Q215S (LMV, ADV)
FC4	-			
MB5	-			
FI6	-			
AL7	-			
BA8	+	D	D2	-
AC9	-			
JG10	+	F	F1b	-
NA11	-			
XK13	+	C	C2	L180M (LMV, LdT)
CD15	+	D	D6	Q215S (LMV, ADV) L217R (ADV)
CA16	-			
HS17	+	F	F4	L180M (LMV, LdT) S202G (ETV) M204V (LMV, LdT)

Por otro lado, con las secuencias obtenidas se construyó un árbol filogenético mediante el método de *Neighbor-joining*, utilizando el fragmento del gen *pol* (dominio TI) ubicado entre los nucleótidos 1165-1705. En la construcción del mismo se utilizaron las secuencias obtenidas de las muestras de pacientes, así como secuencias de referencia obtenidas de la base de datos GenBank (ver sección MM5.a.iii). El árbol filogenético obtenido permitió determinar el genotipo y subgenotipo de la población viral mayoritaria encontrada en cada muestra (figura R20).

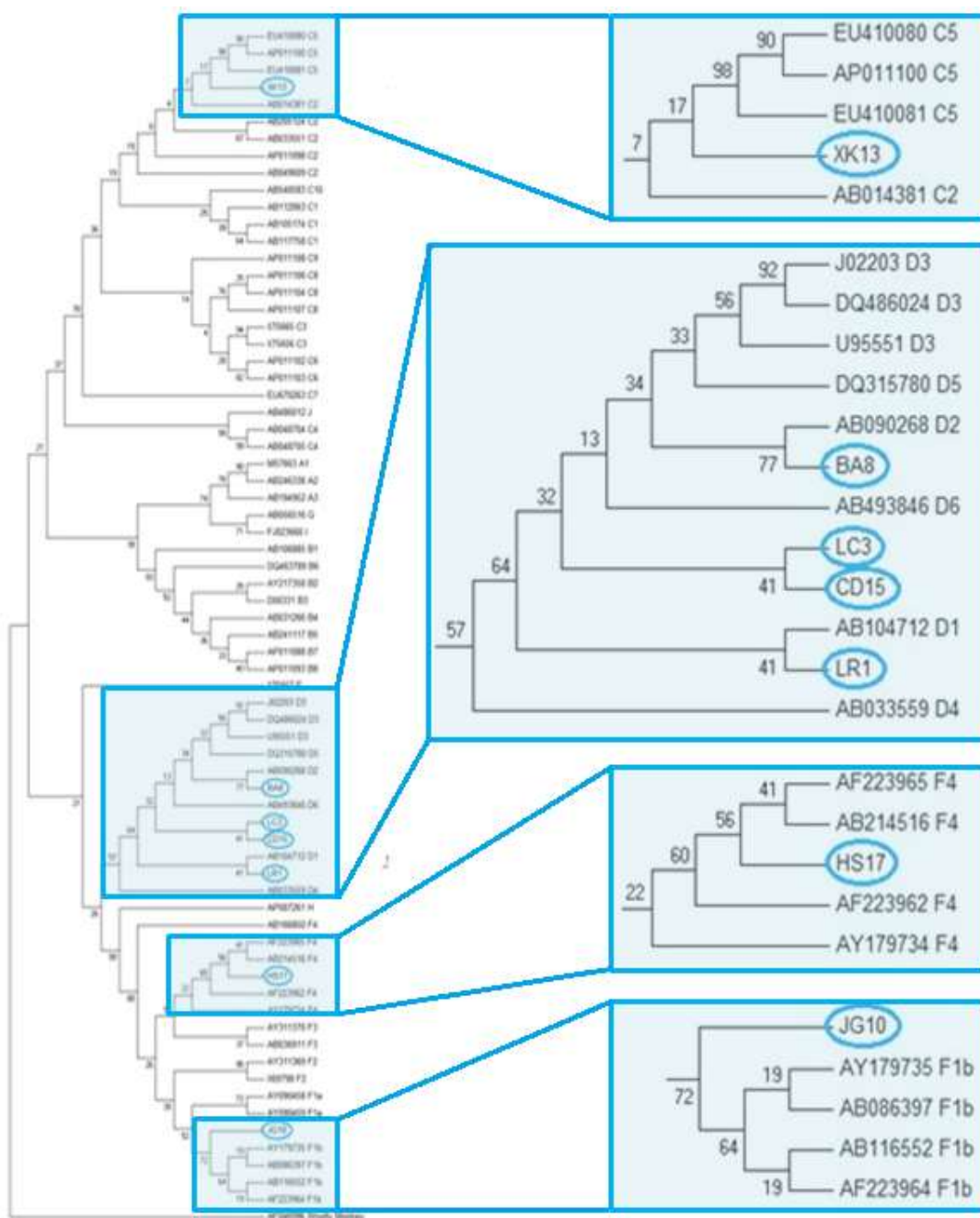


Figura R20. Árbol filogenético generado mediante Neighbor-Joining construido con secuencias nucleotídicas de referencia, depositadas en el GenBank, para el gen *pol* perteneciente a diferentes genotipos y subgenotipos y las secuencias nucleotídicas obtenidas por secuenciación de los fragmentos amplificados en cada muestra. Se indican los valores de remuestreo (Bootstrap) para cada genotipo y subgenotipo. A la izquierda de la figura se muestra el árbol filogenético completo y a la derecha se muestran ampliados los grupos correspondientes a las muestras de interés. Las secuencias correspondientes a los pacientes se destacaron para favorecer su localización en el árbol mediante un círculo celeste.

R3. 2. Estudio de polimorfismos en el gen *ABCC4*/*MRP4* asociados a trastornos en la actividad funcional de dicha bomba

Además de determinar las mutaciones en el genoma viral que predisponían a la aparición de resistencia a la terapéutica, nos interesaba estudiar si los pacientes presentaban alguno de los polimorfismos del gen *ABCC4* reportados que, según la literatura, afectan la función del transportador MRP4 y podrían tener algún tipo de impacto en la respuesta a la terapéutica. Para ello, se extrajo el ADN de PBMC de cada paciente y se amplificaron regiones correspondientes a los polimorfismos a ser estudiados con *primers* específicos (figura R21), según se describe en la sección MM5.b.ii. Cada secuencia fue comparada con las secuencias de referencia NT_009952.14, AC_000056.1 y AC_000145.1, tomadas del NCBI. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla R6, junto con datos de la terapéutica prescrita para cada paciente y el/los tratamiento(s) que había recibido previamente.

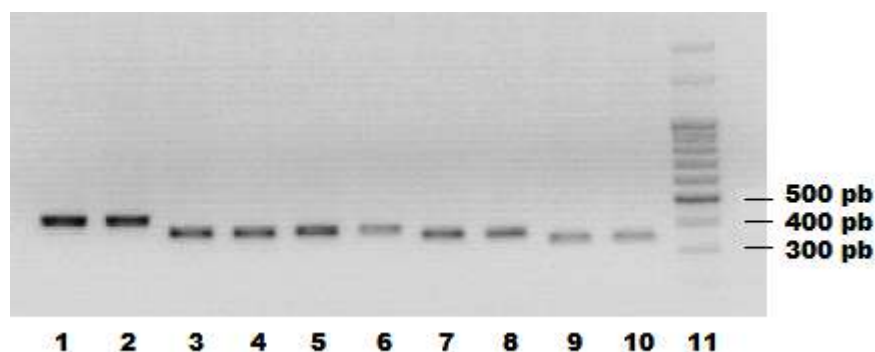


Figura R21. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos por PCR de las muestras LR1 y RB2. Fragmentos para la detección de los polimorfismos rs2274407 (430 pb, calles 1 y 2), rs753414892 (378 pb, calles 3 y 4), rs11568707 (384 pb, calles 5 y 6), rs11568644 (364 pb, calles 7 y 8) y rs3742106 (339 pb, calles 9 y 10). La calle 11 corresponde al marcador de peso molecular.

Tabla R6. Perfil de resistencia para cada muestra estudiada. Se indican los tratamientos antivirales prescritos a cada paciente en el momento de tomarse la muestra, así como los tratamientos previos que había hecho cada uno (en orden cronológico); estos datos fueron proporcionados por el Servicio de Hepatología del Hospital Argerich. Luego se muestran las mutaciones encontradas en el genoma viral (gen de la polimerasa viral, pol) asociadas a resistencia al tratamiento con antivirales (ADV: adefovir dipivoxil, ETV: entecavir, LdT: telvibudina, LMV: lamivudina). Finalmente se indican los polimorfismos del gen ABCC4 encontrados, y entre paréntesis el resultante cambio aminoacídico (todos en heterocigosis, excepto en los casos señalados con #).

Paciente	Tratamiento*	Tratamientos previos	Mutaciones (virales) asociadas a resistencia	Polimorfismo ABCC4
LR1	sd	sd	Y221F (ADV)	rs3742106 (3'UTR)
RB2	sd	sd		rs3742106 (3'UTR)#
LC3	ETV	-	L164M (LMV) S202C (ETV) M204I (LdT) Q215S (LMV, ADV)	rs3742106 (3'UTR)
FC4	LMV+ADV	IFN LMV		-
MB5	ETV	IFN LMV ADV		rs3742106 (3'UTR)
FI6	ST	-		rs3742106 (3'UTR)
AL7	ST	-		rs3742106 (3'UTR)
BA8	ST	-	-	rs3742106 (3'UTR)
AC9	ST	-		-
JG10	ST	-	-	rs3742106 (3'UTR) rs2274407 (Lys304Asn)
NA11	ADV	LMV		rs3742106 (3'UTR) rs11568658 (Gly187Trp)
XK13	LMV	-	L180M (LMV, LdT)	rs2274407 (Lys304Asn)
CD15	ADV	LMV LMV+IFN ETV	Q215S (LMV, ADV) L217R (ADV)	rs3742106 (3'UTR)# rs2274407 (Lys304Asn)
CA16	ADV	LMV		rs3742106 (3'UTR)
HS17	ETV	LMV+IFN LMV	L180M (LMV, LdT) S202G (ETV) M204V (LMV, LdT)	rs3742106 (3'UTR)

*al momento de tomarse la muestra # en homocigosis sd: sin datos ST: sin tratamiento

Con respecto a los polimorfismos encontrados, cabe mencionarse que la mayoría de los pacientes estudiados (12/15) presentaban el polimorfismo rs3742106 (dos de ellos en homocigosis).

Por otro lado, el polimorfismo rs2274407 fue encontrado en 3 pacientes, y el polimorfismo rs11568658 en 1 paciente.

R3. 3. APÉNDICE

Tabla R7. Datos de cada paciente participante en el estudio.

Paciente	Sexo	Edad	Nacionalidad	Origen familia materna	Origen familia paterna	Transaminasas		Biopsia hepática	Vía de infección
						GOT/AST (VN<37 UI/L)	GPT/ALT (VN<41 UI/L)		
LR1	Masculino	18	Argentino	SD	SD	SD	SD	SD	Vertical
RB2	Femenino	49	Argentina	Ucrania	España	SD	SD	SD	Horizontal
LC3	Masculino	57	Argentino	Italia	Italia	SD	SD	HCC y cirrosis	Horizontal
FC4	Masculino	38	Argentino	Italia	Portugal	VN	VN	A1 F1	Horizontal
MB5	Femenino	68	Italiana	Italia	Italia	VN	VN	A3 F2	Horizontal
FI6	Masculino	43	Argentino	Italia	Italia	VN	VN	A1 F0	Horizontal
AL7	Masculino	21	Argentino	Italia	Italia	53	134	A1 F1	Horizontal
BA8	Masculino	50	Paraguayo	España	España	VN	52	A2 F3	Horizontal
AC9	Masculino	58	Español	España	España	VN x2	VN x2	HCC y cirrosis	Horizontal
JG10	Masculino	32	Argentino	Polonia	Rumania	66	178	SD	Horizontal
NA11	Masculino	27	Argentino	Italia	España	SD	SD	SD	Vertical
XK13	Masculino	27	Chino	China	China	VN x3	VN x3	A1 F1	Horizontal
CD15	Masculino	SD	Argentino	SD	SD	211	449	A2 F3	Horizontal
CA16	Masculino	63	Argentino	SD	SD	VN	VN	Cirrosis	Horizontal
HS17	Masculino	44	Argentino	Francia	España	58	98	A1 F2	Horizontal

DISCUSIÓN



*“El que ha llegado tan lejos
que ya no se confunde, ha
dejado también de
trabajar”.*

Max Planck

Si bien los antivirales utilizados en la terapéutica anti-HBV (ANs: lamivudine, telbivudine, adefovir, entecavir y tenofovir) han demostrado ser efectivos en la supresión de la replicación mediante la inhibición de la polimerasa viral, es frecuente la aparición de resistencia en el tratamiento a largo plazo de los pacientes con hepatitis B crónica. Desafortunadamente, debido a las mutaciones virales y a que muchas veces la adherencia al tratamiento es incompleta, el fenómeno de la resistencia a ANs aún es un problema por resolver. Como la eficacia de la terapéutica puede verse afectada por factores virales y del huésped [Zoulim y Locarnini, 2012], uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar si -más allá del mecanismo más conocido y estudiado por el cual HBV genera resistencia a la terapéutica antiviral (a través de la aparición de mutaciones en la polimerasa viral)- existen vías alternativas que favorecen la aparición de resistencia a través de la modulación de la expresión de proteínas de la familia ABC.

Los distintos miembros de la Familia ABC transportan diversos compuestos (tanto exógenos como endógenos) a través de la membrana celular, participando en la resistencia a los fármacos al reducir su concentración intracelular [Fukuda y Schuetz, 2012]. Se ha demostrado que entre los transportadores ABC, MRP4, MRP5, MRP7 y MRP8 están involucrados en la resistencia a ADV y TDF [Fukuda y Schuetz, 2012; Sodani *et al.*, 2012], lo que sugiere que su sobreexpresión puede estar asociada a la falla en la terapéutica. Aunque se ha relacionado a MRP4 con el fracaso de la terapia antirretroviral [Schuetz *et al.*, 1999], las asociaciones con la falla de la terapéutica anti-HBV siguen sin estar dilucidadas. Es por eso que, como ya se mencionó, si bien en los seres humanos los tres tipos principales de proteínas ABC involucrados en MDR incluyen miembros de las sub-familias ABCB, ABCC y ABCG [Mohammad *et al.*, 2018] en el presente trabajo de tesis la investigación se centró principalmente en los transportadores BCRP, MRP4 y MRP5 y en menor medida en MDR1 y MRP1. Esto se debió a que, de acuerdo a nuestro objetivo, seleccionamos transportadores que se expresan normalmente en hígado (o en forma patológica, como ocurre con la inducción de MRP1 en HCC) y que transportan antivirales utilizados en el tratamiento de la infección crónica por HBV (ANs).

Por otro lado, se sabe que la proteína X del HBV (HBx) desempeña un rol determinante en la oncogénesis hepática [Feitelson *et al.*, 2006]: diversos autores han reportado que dicha proteína se encuentra involucrada en la progresión del ciclo celular, la modulación de la apoptosis y la inmortalización celular [Bouchard *et al.*, 2004]. Se ha demostrado su capacidad de transactivar la transcripción de genes celulares principalmente a través de dos mecanismos: la regulación de los niveles de Ca^{2+} intracelular y su unión a diversos factores de transcripción [Bouchard *et al.*, 2004]. Con respecto a esto último, se ha demostrado que tanto la proteína HBx *wt* como la proteína mutada en los codones 130 y 131 son capaces de unirse eficazmente al factor de transcripción celular HNF1 (*hepatic nuclear*

factor 1), tanto *in vitro* como *in vivo*, aumentando la unión de dicho factor al ADN celular (potenciando su efecto), pero cabe mencionarse que -a diferencia de HBx *wt*- se necesita una muy escasa cantidad de la proteína mutada para estimular la actividad de HNF1 (es decir HBx mutada presenta un efecto transactivador más potente que la proteína *wt*) [Li *et al*, 2002]. Estas diferencias funcionales entre ambas proteínas pueden tener importantes implicancias en la patogénesis de la infección por HBV y podrían explicar el hecho de que aquellos pacientes con infección crónica por una cepa del HBV que presenta estas mutaciones tienen un mayor riesgo de desarrollar HCC [Kao *et al*, 2003]. Por este motivo, y teniendo en cuenta que el genotipo de HBV más prevalente en nuestro país es el genotipo F, en nuestro laboratorio se clonaron secuencias de HBx *wt* y mutada en los codones 127, 130 y 131 (en ambos casos aisladas de pacientes infectados con HBV genotipo F) y se estudiaron los efectos de la expresión de las mismas en distintas líneas celulares hepatocitarias.

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que la expresión transitoria de HBx mutada en células de estirpe hepatocitaria produce un aumento en el ARNm de *ABCC1/MRP1* y *ABCC2/MRP2* [Cuestas, 2010]. Es por esto que en el presente trabajo se decidió en principio estudiar el efecto tanto de la replicación del HBV (en un modelo *in vitro*: células HepG2.2.15) como de la proteína HBx sobre la expresión de genes de la familia ABC involucrados directamente sobre el transporte de ANs: *ABCG2/BCRP*, *ABCC4/MRP4* y *ABCC5/MRP5*. Subsiguientemente, se estudió el efecto de la replicación viral en su conjunto y de la expresión de HBx -tanto *wt* como mutada- sobre los promotores de los genes *ABCG2/BCRP* y *ABCC4/MRP4*.

Con relación a esto, documentamos un aumento en la expresión de *ABCC4* y una disminución en la expresión de *ABCG2* -en ambos casos tanto a nivel de proteína como de ARNm- debido a la replicación del HBV. En este mismo sistema de estudio no se detectaron cambios en la expresión de *ABCC5*. Si bien estos resultados por sí solos no permiten confirmar un mecanismo compensatorio de expresión entre BCRP y MRP4, el hecho de que este mismo esté descripto para BCRP y MDR1 [Cisternino *et al.*, 2004], permite la posibilidad de que este tipo de mecanismos regulen la expresión de otros genes de la familia ABC.

Con el objeto de dilucidar si la regulación de la expresión de estas bombas ABC por parte de HBV es a nivel transcripcional se estudió el comportamiento de los promotores de los genes *ABCG2* y *ABCC4* en el contexto de la replicación viral. Para esto se utilizaron dos variantes del promotor del gen *ABCC4*: uno completo de 2,3 Kpb, y otro truncado de 1,8 Kpb; mientras que en el caso del promotor de *ABCG2* el fragmento estudiado abarcó 1,6 Kpb (figura D1). Se registró un aumento significativo de la actividad del promotor de *ABCC4* (completo y truncado) debido a la replicación viral, mientras que la actividad del promotor de *ABCG2* no se vio afectada. Esto corrobora los datos obtenidos previamente al medir los niveles de expresión (proteína y ARNm) de *ABCC4*; aunque no justifica el marcado descenso en la expresión de *ABCG2*. En este sentido se podría

especular que tal vez la regulación de la expresión de esta proteína ABC sea llevada a cabo por mecanismos post-traduccionales.

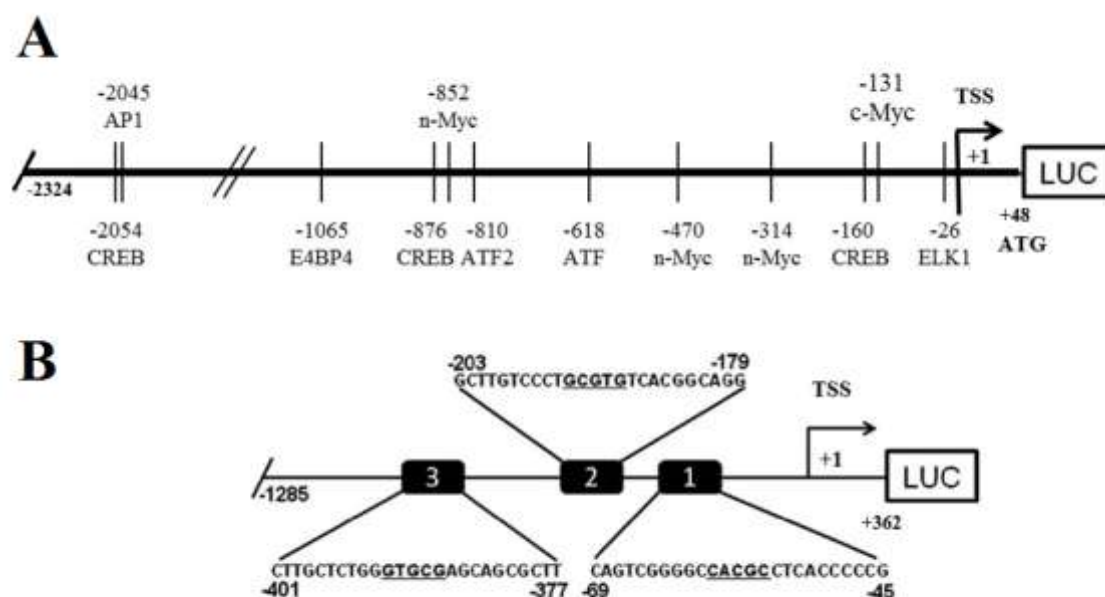


Figura D1. Regiones de los promotores de ABCC4 **(A)** y ABCG2 **(B)** clonados en un vector pGL3 río arriba del gen reportero luciferasa. En **(A)** se indican los sitios putativos de unión a factores de transcripción asociados a la señalización del AMPc determinados utilizando el programa MatInspector (Genomatix Suite Software) [adaptado de Carozzo, 2015]. En **(B)** se señalan tres elementos de respuesta a AhR (AhRE) que se encuentran en la región promotora estudiada, entre los nucleótidos -45/-69, -179/-203 y -377/-401 [adaptado de Tompkins et al., 2010].

TSS: sitio de inicio de la transcripción.

Con el objeto de ahondar en los mecanismos mediante los cuales HBV modifica la expresión de algunos transportadores ABC durante su ciclo de replicación es que decidimos estudiar la expresión de estos mismos transportadores en un contexto donde la única proteína viral que se expresa es HBx, ampliamente reconocida como un fuerte regulador de la transcripción de genes virales y celulares. En este sentido pudimos determinar que la expresión de HBx –tanto *wt* como mutada– no afectó los niveles de los ARNm de las tres bombas ABC estudiadas. Esto se condice con los niveles de proteína documentados, con la sola excepción de la proteína BCRP que se mostró elevada en células que expresaban HBx-*wt*.

Teniendo en cuenta la baja eficiencia de transfección (aproximadamente 35%) y que tanto la *qPCR* como el *Western blot* son técnicas en las cuales se mide el producto de la expresión génica correspondiente a la totalidad de las células en cultivo, existe la posibilidad de que haya variaciones en las células transfectadas

que resulten indetectables por un “efecto de dilución” (en una mayoría de células no transfectadas). Es por esto que además decidimos medir el efecto de HBx sobre los promotores de *ABCC4* y *ABCG2* utilizando luciferasa como gen reportero: la ventaja de este método por sobre los anteriores es que la luminiscencia que se detecta es producto de la actividad del promotor correspondiente sólo en las células transfectadas efectivamente, por lo cual se evita este efecto de “dilución” con las células no transfectadas. Estos estudios nos permitieron documentar variaciones en la actividad del promotor de *ABCC4* (completo y truncado) debido a la expresión de la proteína viral aislada. En este sentido registramos una disminución significativa en dicha actividad en las células que expresaban HBx-wt, mientras que en las células que presentaban expresión de HBx mutada esta actividad se mostró aumentada con respecto al control. Por otro lado, no se documentaron cambios en la actividad del promotor de *ABCG2* debido a la mera expresión de la proteína viral (tanto *wt* como mutada). Si bien estos resultados pueden resultar contradictorios existen gran cantidad de reportes en la literatura internacional que dan cuenta del comportamiento diferencial de HBx mutada respecto de HBx-wt; como por ejemplo la afinidad diferencial por distintas proteínas involucradas en la proliferación celular [Siddiqui, *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2016].

Las diferencias aquí documentadas entre el sistema de replicación *in vitro* de HBV y la mera expresión de la proteína HBx podrían deberse a la acción de otras proteínas virales que también actúen modulando la expresión de MRP4 y/o BCRP ya que en el caso de las células HepG2.2.15 está presente el genoma completo del HBV. Es sabido que, si bien HBx tiene un rol preponderante en cuanto a la transactivación de genes celulares, no es la única proteína del HBV con esta capacidad: se ha reportado que la expresión de pre-S y preS2Δ en células HuH-7 induce la expresión de Bcl-2, la subunidad p65 de NF-κB, ERK, y la fosforilación de Akt [Hung *et al.*, 2011]. Por otro lado, tampoco puede descartarse el efecto del genotipo viral en las diferencias documentadas en esta tesis (HBx-genotipo D en las células HepG2.2.15 y HBx-genotipo F en células transfectadas) ya que, como se observa en el perfil de hidrofobicidad de la figura D2, hay notorias variaciones que podrían implicar un comportamiento diferencial como transactivador génico. En este sentido, Liu y col. documentaron un aumento en la expresión del ARNm de *ABCB1*, *ABCC1* y *ABCG2* cuando transfectaron células HuH-7 con HBx [Liu *et al.*, 2013], utilizando para ello una secuencia de HBx aislada de células HepG2.2.15 (es decir, HBx-genotipo D). Lo anterior permite explicar las diferencias con los resultados obtenidos en este trabajo y confirma la hipótesis de que variaciones en la secuencia de HBx pertenecientes a distinto genotipo viral podrían variar su comportamiento transactivador. En el trabajo mencionado, se demuestra que la inducción de la expresión de dichos ARNm de la familia ABC está mediada por la activación de la vía de NF-κB.

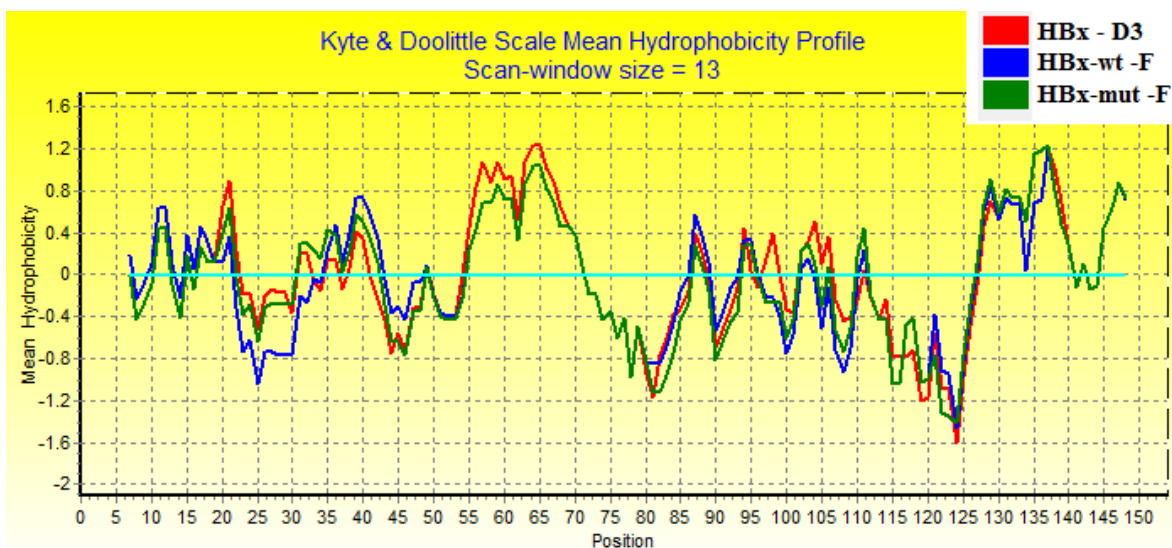


Figura D2. Gráfico comparativo del perfil de hidrofobicidad de las secuencias aminoacídicas de HBx en las células HepG2.2.15 (genotipo D, subgenotipo D3) y HBx-wt y mutada utilizadas en la transfección de células hepatocitarias (algoritmo de Kyte & Doolittle).

Finalmente, no se registraron variaciones en la actividad del promotor de *ABCG2* cuando se transfectaron células HepG2/C3A con HBx-wt ni mutada. Esto parecería discordante con el resultado obtenido en el *Western blot*, en el cual se documentó un aumento de BCRP al transfectar células HuH-7 con HBx-wt, pero no hay que perder de vista que si bien ambas líneas celulares son de origen hepatocitario, son líneas celulares distintas, motivo por el cual hay que ser muy cautelosos en la elaboración de comparaciones. Si bien se intentó realizar el ensayo de actividad de promotores en ambas líneas celulares de manera de poder comparar de forma directa los resultados, los valores de luminiscencia obtenidos fueron muy bajos en HuH-7 (pese a repetidos intentos de optimizarlos) por lo cual no permitieron arribar a ninguna conclusión y fueron descartados. Con las salvedades antes mencionadas, tomados en conjunto estos resultados podrían indicar que la proteína HBx no estaría actuando en la regulación de este gen afectando directamente la actividad del promotor, pero sí podría tener algún efecto a nivel traduccional o post-traduccional: no hay que perder de vista que la regulación en la expresión de estas proteínas no ocurre sólo a nivel de la transcripción y la traducción, sino que existen mecanismos post-traduccionales (glicosilaciones, fosforilaciones) que determinan su translocación a membrana y la consecuente funcionalidad de la proteína [Nakanishi y Ross, 2012]. HBx podría estar afectando factores encargados de la regulación post-traduccional o incluso factores involucrados en la degradación proteica [Minor y Slagle, 2014].

La regulación de la expresión de los genes de la familia ABC se produce a través de la actividad de receptores nucleares activados por ligandos: PXR y/o CAR son capaces de regular la expresión de genes de esta familia en tejidos tales como cerebro, hígado, intestino, así como en PBMCs [Assem *et al.*, 2004; Albermann *et al.*, 2005; Burk *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2011]. Se sabe que estos dos receptores nucleares interactúan con ligandos endógenos y una amplia gama de agentes farmacológicos y, por lo tanto, son reconocidos como importantes sensores de xenobióticos [Urquhart *et al.*, 2007]. Si bien la expresión de las proteínas ABC está regulada por algunos factores de transcripción en común, también hay otras vías independientes. Esto se evidencia en que ante ciertos estímulos, puede aumentar la expresión de alguna(s) de ellas, disminuir la de otra(s) o no modificarse, como ocurre por ejemplo ante el tratamiento con ácido úrico en células endoteliales, donde disminuye la expresión de BCRP mientras que no se modifica la de MRP4 [Komori *et al.*, 2018]. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la regulación en la expresión de estas proteínas no ocurre solo en la transcripción y la traducción, sino que, como se mencionó anteriormente, existen mecanismos post-traduccionales (glicosilaciones, fosforilaciones) que determinan su translocación a membrana y la consecuente funcionalidad de la proteína [Nakanishi y Ross, 2012]. Todos estos mecanismos coexisten y participan en la regulación de la expresión de los genes ABC de forma tejido-específica y según los estímulos que reciba ese tejido, conformando una compleja red de regulación.

En el hígado, la expresión de *ABCC4* está regulada positivamente por una red de receptores nucleares entre los que se encuentran PPAR α [Moffit *et al.*, 2006], AhR, Nrf2 (un sensor de estrés oxidativo) [Xu *et al.*, 2010] y CAR [Assem *et al.*, 2004]. Se ha demostrado que PPAR α , AhR y Nrf2 se unen específicamente al promotor de *ABCC4* y activan su transcripción [Moffit *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2010; Iwano *et al.*, 2010]. Xu y col. demostraron la existencia de tres sitios XRE (elementos de respuesta a xenobióticos, sitios de unión de AhR) ubicados a -109 pb, -171 pb y -254 pb del sitio de inicio de la transcripción, así como un sitio de unión a Nrf2 a -141 pb. Estos autores utilizaron inicialmente tres fragmentos de distinto tamaño con el objetivo de caracterizar dicho promotor: -2034/-72, -761/-72 y -238/-72; mientras que en el primer caso documentaron una actividad del promotor 26 veces más alta que en el control, con los dos últimos fragmentos la actividad fue 53 y 38 veces mayor que en el control, respectivamente; demostrando que el promotor basal estaría ubicado aproximadamente desde -761 pb hacia el sitio de inicio de la transcripción. Por otro lado, se ha demostrado que el mecanismo por el cual CAR activa dicho promotor, involucra una competencia con FXR (regulador negativo de *ABCC4*) ya que en el mismo hay un elemento de respuesta a CAR (CARE) y un elemento de respuesta a FXR (FXRE), los cuales se encuentran superpuestos [Renga *et al.*, 2011] en la región que abarca los nucleótidos -892/-651. Todos esos elementos regulatorios están

incluidos en ambos fragmentos del promotor empleados en los ensayos de este trabajo.

En lo que refiere a la expresión de *ABCG2*, la misma es regulada a través del uso alternativo de promotores (designados como E1A y E1B/C) en forma tejido-específica. De manera similar a lo que ocurre con otros promotores de genes ABC, este promotor E1B/C de BCRP carece de *TATA-box*, contiene varios sitios SP1, y está río abajo de una isla de CpG. Hasta la fecha, se han caracterizado varios factores de transcripción y sus respectivos elementos reguladores en el promotor de *ABCG2* [Natarajan *et al.*, 2012]. Entre ellos, cabe destacarse que Nrf2 regula positivamente la expresión de BCRP a través de su interacción directa con un elemento de respuesta a antioxidantes (ARE) en el promotor de *ABCG2* [Singh *et al.*, 2010]. En respuesta a los tratamientos con inhibidores de HDAC, AhR se disocia de su proteína asociada HSP90, se une al elemento de respuesta a AhR (AhRE) y estimula la transcripción de *ABCG2* [To *et al.*, 2011]. Además de la unión de los factores de transcripción individuales, la unión de ER facilita la unión cooperativa y la regulación transcripcional de *ABCG2* por p65 (NF- κ B) [Pradhand *et al.*, 2010]. Por otro lado, mediante la sobreexpresión de los factores de transcripción o el tratamiento con ligandos específicos de dichos factores, se identificaron además a PPAR α , PXR, GR y c-Myc como elementos reguladores de la expresión de *ABCG2* [Szatmari *et al.*, 2006; Honorat *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2009; Naspinski *et al.*, 2008].

Comparando los elementos regulatorios de los genes *ABCG2* y *ABCC4* podemos constatar que algunos de ellos son comunes a ambos genes y que inclusive algunos de estos podrían ser regulados por HBx. La activación de la vía de transducción de señales Raf-MEK-ERK juega un papel central para la modulación de los factores de transcripción por HBx, lo que lleva a la activación de diversos elementos de los promotores. Por ejemplo, se ha demostrado que el HBV es capaz de inducir la activación de genes regulados por Nrf2 a través de HBx y preS2 [Schaedler *et al.*, 2010] y, como ya fue mencionado, se ha demostrado que la inducción de la expresión de algunos ARNm de la familia ABC está mediada por la activación de la vía de NF- κ B (subunidad p65) [Liu *et al.*, 2013].

Por otro lado, existen evidencias en la literatura que documentan que HBx es capaz de estimular la expresión de *ABCB1/MDR1* y *ABCC1/MRP1* a través de la vía de las MAP quinasas, registrándose un aumento en la fosforilación de ERK1/2 en células HepG2 transfectadas establemente con HBx [Guan *et al.*, 2004]. Teniendo en cuenta este antecedente, se decidió evaluar esta vía de transducción de señales en nuestro sistema de estudio. En primer lugar, se estudió si había diferencias en la fosforilación de ERK1/2 entre las células HuH-7 transfectadas con HBx (*wt* y mutada) y las no transfectadas, no registrándose diferencias significativas. Estos resultados muestran que, si bien la fosforilación de ERK1/2 no está afectada, si podría estarlo la fosforilación de otras MAPK involucradas en esta vía, y estas podrían a su vez afectar la expresión de diversas

proteínas, entre ellas proteínas de la familia ABC. Luego de la finalización de la parte experimental de esta tesis, Belkahla y col. [Belkahla *et al.*, 2018] documentaron que la vía de señalización ERK5/MEF2 controla la expresión de algunas de las bombas ABC (ABCB1/MDR1, ABCC1/MRP1, ABCC5/MRP5 y ABCG2/BCRP) por una vía dependiente de p53.

En paralelo se estudió si había diferencias en los niveles de ARNm de *MKP-1* como consecuencia de la expresión de HBx; dicha fosfatasa actúa como regulador fisiológico de la vía de las MAPKs y se une directamente a Nrf2 estabilizándolo. En este sentido, si bien no se registraron diferencias entre HepG2, HepG2/C3A y HepG2.2.15, sí hubo diferencias en células HuH-7 transfectadas con HBx (tanto *wt* como mutada) respecto de las células control, pero solo luego de 24 h de transfección, mientras que dicho efecto se pierde a las 72 h de expresión.

En condiciones normales, la proteína Keap1 actúa secuestrando a Nrf2 – factor que se une al promotor de *ABCC4* y activa su transcripción- llevando a que este último se degrade por la vía de proteasoma, por lo cual hay un nivel de expresión basal de MRP4. Por otro lado, se ha demostrado que MKP-1 es capaz de favorecer la actividad de Nrf2 interactuando con él y estabilizándolo, de forma de estimular la transcripción de los genes regulados por este factor [Luo *et al.*, 2018].

Según los resultados obtenidos en esta tesis nuestra hipótesis es que en los hepatocitos infectados con HBV, HBx actuaría por un doble mecanismo estimulando a Nrf2: por un lado secuestra a Keap1 (mediante la unión a la proteína adaptadora p62), formando el complejo HBx-p62-Keap1 y liberando a Nrf2 e induciendo su actividad como factor de transcripción [Liu *et al.*, 2015], y por otro lado estimulando la expresión de MKP-1. Esta fosfatasa regula positivamente a Nrf2 a través de su interacción directa, estabilizándolo [Luo *et al.*, 2018]. De esta forma, HBx actuaría favoreciendo la sobreexpresión de genes como *ABCC4* -por medio de la estabilización y activación de Nrf2- evento que podría conducir a eventos de resistencia a múltiples drogas (MDR) tanto en la terapéutica antiviral como en la anti-neoplásica (figura D3).

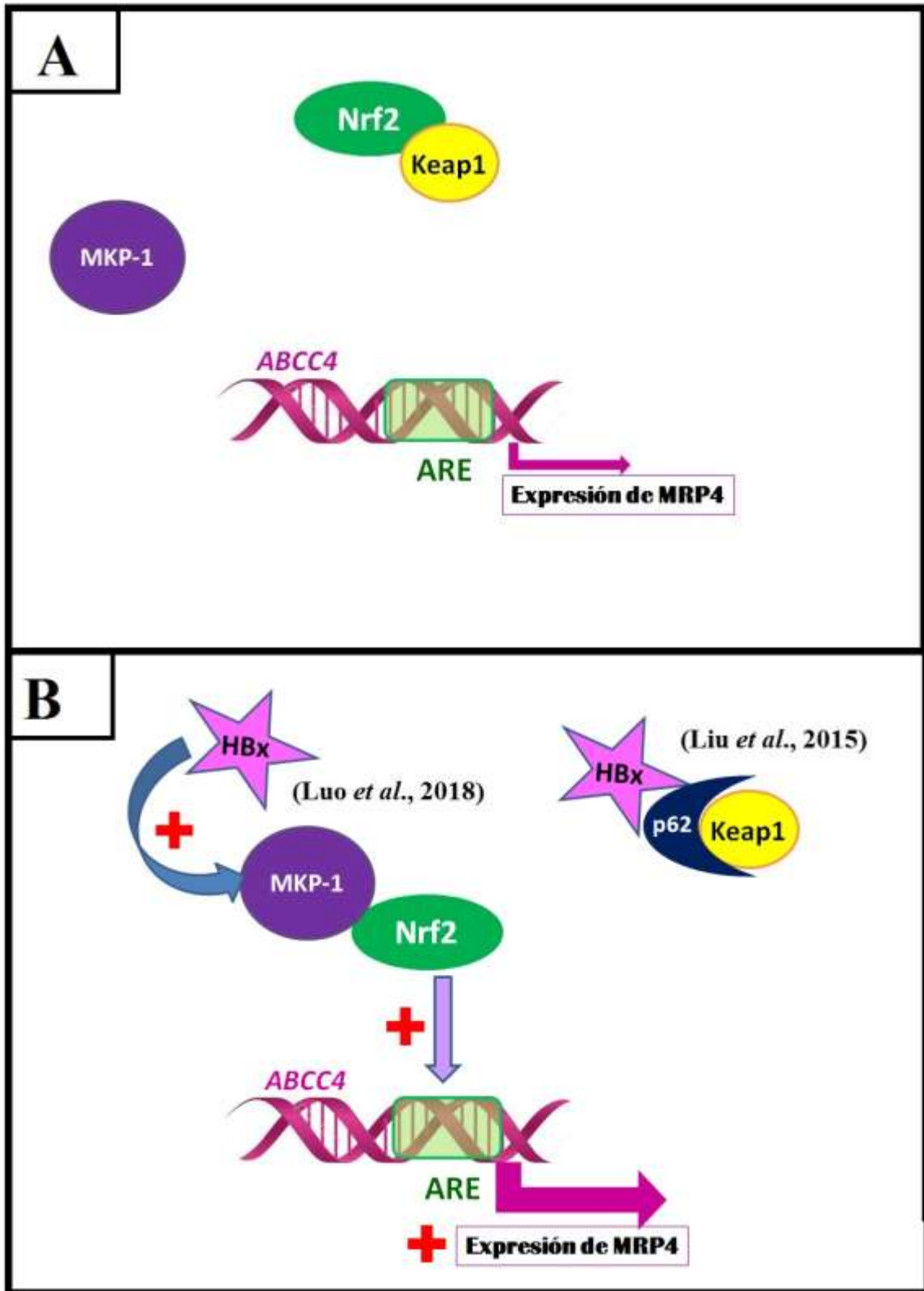


Figura D3. Mecanismo de regulación propuesto de HBx sobre la expresión de ABCC4. **A.** En condiciones normales, Keap1 actúa secuestrando a Nrf2 y llevando a que este último se degrade por la vía de proteasoma, por lo cual hay un nivel de expresión basal de los genes que son regulados por este factor, entre ellos ABCC4. **B.** En los hepatocitos infectados con HBV, HBx actuaría por un doble mecanismo estimulando a Nrf2: por un lado secuestra a Keap1 (mediante la unión a la proteína adaptadora p62), formando el complejo HBx-p62-Keap1 y liberando a Nrf2 e induciendo su actividad como factor de transcripción [Liu et al., 2015], y por otro lado estimulando la expresión de MKP-1. Esta fosfatasa regula positivamente a Nrf2 a través de su interacción directa, estabilizándolo [Luo et al., 2018]. De esta forma, HBx actuaría favoreciendo la sobreexpresión de genes como ABCC4 (entre otros cuya transcripción está regulada por la presencia de elementos ARE en su promotor), por medio de la estabilización y activación de Nrf2.

Si bien actualmente están disponibles comercialmente nuevas drogas antivirales, tales como los inmunomoduladores IFN- α pegilado y timosina α -1, los análogos de nucleósido entecavir y telbivudina, y el análogo de nucleótido tenofovir, y aunque estos muestran ser más eficaces que los antivirales utilizados antiguamente, todavía demandan la optimización de los regímenes de administración. Por ello, ensayar nuevas drogas que puedan aumentar el arsenal terapéutico empleado en el tratamiento de la hepatitis B crónica constituye un gran desafío actual. Es por esto que en este trabajo de tesis se intentó –además de tratar de dilucidar algunos de los mecanismos moleculares que llevan a la falla de la terapéutica- plantear estrategias de tratamiento antiviral alternativas a las actuales.

La aparición de MDR evidencia la necesidad de nuevos fármacos para sortear este problema. Sin embargo, esta expectativa es poco realista teniendo en cuenta lo extensos que resultan los períodos de desarrollo de fármacos y la alta proporción de fallas. Por lo tanto, parece más razonable seleccionar un "fármaco adyuvante" que pueda aumentar la eficacia de los tratamientos con los antivirales ya existentes: el fármaco adyuvante podría mejorar el efecto antiviral del AN utilizado, al mismo tiempo que se reduciría la dosis y la toxicidad del mismo. Los co-polímeros de poli(óxido de etileno) [PEO] y poli(óxido de propileno) [PPO] constituyen una alternativa atractiva para optimizar aspectos tecnológicos de los fármacos y superar un amplio espectro de desventajas (bio)farmacéuticas.

En primer lugar, en el presente trabajo se evaluó la actividad antiviral de cuatro análogos de nucleósidos, obtenidos mediante síntesis química a partir del 2-amino-1-indanol. De los 4 compuestos, sólo uno de ellos (derivado de purina, designado como "compuesto 4") exhibió una actividad antiviral considerable frente al HBV, motivo por el cual fue seleccionado para continuar con los ensayos siguientes. Cabe mencionarse que no se hicieron ensayos que compararan la actividad antiviral del compuesto 4 con la de los ANs aprobados por la FDA y que se utilizan en forma habitual en el tratamiento de la hepatitis B crónica. Este no

era uno de los objetivos principales del presente trabajo, como sí lo era buscar un fármaco adyuvante cuya incorporación al tratamiento permitiera disminuir la dosis de AN utilizado, disminuyendo así la exposición sistémica al compuesto antiviral y sus consecuentes efectos adversos. Sin embargo, dados los resultados satisfactorios obtenidos con el compuesto 4 no se descartan futuros ensayos con el objetivo de validarlo como antiviral.

Posteriormente se procedió a realizar diferentes ensayos que permitieran seleccionar un co-polímero adecuado para combinar con el AN seleccionado en este trabajo de tesis. Como se mencionó anteriormente, se ha documentado que la máxima inhibición de la actividad funcional de MDR1 se obtiene con aquellos co-polímeros de PEO-PPO que presentan valores de BHL moderados o bajos, y un número de unidades de PPO entre 30 y 50 [Álvarez-Lorenzo *et al.*, 2010]. Es por eso que en el presente trabajo se evaluaron las poloxaminas Tetronic® T304, T904, T1107 y T1301 y el poloxámero Pluronic® F127 (P407).

Considerando la bibliografía que da cuenta de su potencial como moduladores de la actividad de algunas bombas de membrana se decidió estudiar si los co-polímeros seleccionados tenían algún efecto sobre la expresión del ARNm de algunos de los transportadores ABC más representativos. Estudios enfocados en la modulación de la expresión génica por los poloxámeros han reportado que P85 es capaz de activar la expresión del gen de luciferasa bajo el control del promotor de CMV y elementos de respuesta a NF- κ B y a p53. Los efectos diferenciales de P85 sobre este promotor y la selectividad demostrada con respecto al elemento de respuesta a NF- κ B son consistentes con la activación de la vía de señalización de NF- κ B [Yang *et al.*, 2005]. NF- κ B y p53 se regulan transcripcionalmente entre sí en forma cruzada y, a su vez, presentan actividades regulatorias relacionadas. Por lo tanto, es posible que P85 pueda activar ambos factores de transcripción al afectar componentes de señalización iguales o relacionados. Tomando en cuenta los trabajos ya mencionados que evidencian el rol de NF- κ B sobre la expresión de algunos genes ABC, decidimos evaluar si los co-polímeros seleccionados tenían algún efecto sobre la expresión de estos genes (particularmente un aumento de la misma), de manera de descartar dicho efecto indeseado (ya que esto disminuiría la concentración intracelular de antiviral, que es justamente el efecto contrario al buscado).

Idealmente, el objetivo era seleccionar aquellos co-polímeros capaces de afectar negativamente la expresión de los transportadores ABC estudiados, o que al menos no afectaran significativamente dicha expresión. Para ello se realizó un primer análisis orientativo en células HuH-7 tratadas con los co-polímeros, estudiando la expresión de *ABCB1*, *ABCC1* y *ABCG2*, para luego hacer lo mismo, pero en forma más exhaustiva, en células HepG2.2.15 (modelo *in vitro* de replicación del HBV) aumentando el número de genes estudiados. Como algunos de los co-polímeros que presentaron el efecto modulador negativo más pronunciado en HuH-7 (por ejemplo T1107 y T1301) resultaron citotóxicos en HepG2.2.15, decidimos evaluar el efecto de todos los co-polímeros que hubieron

resultado citocompatibles en las concentraciones ensayadas en esta última línea celular. De esta forma, se determinó que los únicos co-polímeros que disminuyeron significativamente el ARNm de alguno de los transportadores estudiados fueron T304 al 0,1% y T904 al 0,01%, disminuyendo ambos la expresión del ARNm de *ABCG2*. Como paralelamente T904 aumentó la expresión de *ABCB1*, *ABCC1* y *ABCC4*, este co-polímero fue desestimado para los siguientes ensayos, dado que este era un efecto contrario al buscado. El resto de los compuestos aumentó la expresión de al menos uno de los ARNm estudiados, excepto el F127 al 0,1% que no afectó significativamente la expresión de ninguno de ellos. Por este motivo, en la etapa siguiente se continuaron estudiando sólo los co-polímeros T304 y F127, ambos al 0,1%.

Posteriormente, se decidió evaluar si los co-polímeros T304 y F127 presentaban alguna actividad antiviral intrínseca, de forma de determinar si alguno de ellos resultaba más apropiado para combinar con el AN seleccionado. La incubación de células HepG2.2.17 con los mismos permitió establecer que F127 presenta una actividad antiviral considerable (disminución en más del 30% de la carga viral y en más del 80% de HBsAg y HBeAg respecto del control, luego de 7 días de incubación), no así T304, motivo por el cual se continuaron los ensayos con el primero.

Finalmente, en función del resultado anterior se trataron las células HepG2.2.15 con una combinación del AN que presentó mayor actividad antiviral (compuesto 4) con F127 al 0,1%, de manera de determinar si esta combinación permitía mejorar la actividad antiviral del primero. Se obtuvo una disminución significativa de la detección de antígenos virales en el sobrenadante no sólo con la incubación con el AN o con el poloxámero, sino que también fue significativa dicha disminución cuando se compararon las células tratadas con la combinación de ambos compuestos respecto de la incubación con uno u otro compuesto por separado. Estos resultados evidencian no sólo la capacidad antiviral intrínseca del AN y el co-polímero seleccionados, sino que la combinación de ambos compuestos potencia el efecto que estos tienen por separado, demostrando un efecto sinérgico en su actividad antiviral.

Paralelamente, y para confirmar que F127 y su combinación con el AN escogido resultara inerte en cuanto a la expresión de genes ABC, al cabo de los 10 días de incubación se evaluaron los niveles de ARNm de dichos genes en las células tratadas: los resultados obtenidos indican que ni los compuestos seleccionados (AN y poloxámero) por separado, ni su combinación afectaron la expresión de los transportadores estudiados.

Consideramos que, conjuntamente, estos resultados justifican evaluar la incorporación de nuevos compuestos a la terapéutica anti-HBV actualmente en uso, ya que su combinación con compuestos como F127 podría reducir la dosis necesaria de análogos de nucleósidos (y consiguientemente, disminuir sus posibles efectos adversos), así como aumentar su eficacia. Particularmente, F127 no sólo presenta actividad antiviral intrínseca, sino que su combinación con un

AN potenció el efecto antiviral del mismo sin afectar de manera indeseada la expresión de los ARNm de los transportadores ABC estudiados. Corresponde remarcar que este poloxámero ya está aprobado por la FDA para su uso en humanos, por lo que su incorporación sería menos dificultosa que la de nuevos compuestos.

En lo que respecta al mecanismo por el cual F127 actúa como antiviral, aún no hemos realizado estudios al respecto y hasta el momento en la literatura solo existen reportes acerca de la utilización de co-polímeros como vehículos de administración de drogas, pero hasta donde sabemos este es el primer trabajo en el que se demuestra la capacidad antiviral intrínseca de uno de ellos (F127). Sin embargo, se ha reportado que ciertos unímeros de Pluronic pueden localizarse selectivamente en dominios particulares de la membrana celular (*lipid rafts* o “balsas lipídicas”) [Sahay *et al.*, 2008], por lo cual siendo HBV un virus envuelto, es posible especular con que estos compuestos actúen impidiendo o perjudicando la salida del virus de la célula. En este trabajo se determinó la carga viral y antigénica en el sobrenadante celular, por lo cual solo podemos afirmar que F127 disminuye la liberación de partículas virales al sobrenadante, pero no podemos determinar en cuál de los pasos anteriores se interrumpe el proceso de generación/liberación de dichas partículas.

Por otro lado, si bien la expresión de los transportadores ABC estudiados no resultó afectada (al menos a nivel del ARNm), como ya se mencionó anteriormente, la regulación de la expresión y funcionalidad de los mismos está regulada en múltiples niveles. Existen fuertes evidencias que indican que el microambiente lipídico de las membranas biológicas está estrechamente relacionado con la función de los transportadores ABC [Romsicki *et al.*, 1999]. Se sugirió que la inhibición de estas proteínas ocurre debido a cambios conformacionales en las mismas y/o por un impedimento estérico de la interacción proteína-fármaco en los sitios de unión generado por las cadenas de co-polímeros sumergidas en la membrana plasmática [Batrakova *et al.*, 2004]. Por lo cual, no puede descartarse que, más allá del efecto antiviral de F127, este pueda tener un rol regulatorio de la actividad de las bombas ABC (tal como se ha demostrado para P85), reduciendo la salida de la droga antiviral utilizada y sumando así otro efecto beneficioso para la terapéutica que no se ha estudiado en este trabajo, pero que podría constituir una línea de investigación complementaria del mismo.

Otro de los objetivos de este trabajo de tesis –además del estudio molecular *in vitro* de la MDR y su reversión- fue estudiar *in vivo* las bases genéticas virales y del hospedador que justifiquen la falla en la terapéutica antiviral. Debido a esto se estudió en pacientes crónicamente infectados con HBV la presencia de características del virus y del paciente que pudieran favorecer la aparición de resistencia a la terapéutica antiviral. Para lo cual se estudiaron tanto mutaciones presentes en el genoma viral a partir de ADN aislado del suero de cada paciente,

así como polimorfismos en el gen *ABCC4* a partir de ADN aislado de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).

En lo que respecta al genoma viral, se amplificó un fragmento del genoma de HBV que permitió la genotipificación del virus y el estudio de mutaciones en el dominio transcriptasa inversa (TI) de la polimerasa viral que han sido reportadas en la literatura como causa de resistencia a los ANs utilizados en el tratamiento anti-HBV (ver figura I7, *European Association for the Study of the Liver*, 2017). En algunos casos, pese a la utilización de 3 pares de *primers* distintos -usados en distintas combinaciones de *nested-PCR*- no fue posible amplificar el ADN viral. En algunos casos (FC4, MB5, NA11) se trataba de pacientes que ya estaban en tratamiento por lo que presentaban baja carga viral (CV). Sin embargo, esta correlación (baja CV *vs* PCR[-]) no fue aplicable a todas las muestras estudiadas. Otras causas de la falta de amplificación del DNA viral pudieron ser: la presencia de mutaciones en el sitio de unión de los *primers* o a una inadecuada conservación de la muestra de sangre/suero. Debido a que en todas las muestras fue posible la amplificación por PCR de las regiones estudiadas del gen del hospedador *ABCC4* esta última hipótesis podría descartarse.

Los genotipos de HBV registrados -en las muestras en las que se pudo amplificar el ADN viral- son los que circulan habitualmente en nuestro país; donde el genotipo más prevalente es el F, seguido por A, D, C y B, teniendo en realidad el genotipo D una distribución universal [Pisano *et al.*, 2016; Delfino *et al.*, 2015]. De las muestras aquí estudiadas 4 resultaron genotipo D, 2 genotipo F y 1 genotipo C; perteneciendo esta última muestra a un paciente de origen chino (existiendo en Asia una mayor prevalencia de los genotipos B y C).

Se reportan en este trabajo de tesis diversas mutaciones asociadas a resistencia a los análogos de nucleósidos lamivudina, adefovir, entecavir y telvudina. Estas mutaciones se documentaron en 5 de los 7 pacientes en los que se pudo amplificar el dominio TI de la transcriptasa inversa; dichos pacientes estaban bajo tratamiento antiviral. Cabe destacarse que en las muestras de dos pacientes *naïve* de tratamiento (BA8 y JG10) no se detectaron mutaciones que estén reportadas como causa de resistencia a ANs.

Además de determinar las mutaciones en el genoma viral que predisponían a la aparición de resistencia a la terapéutica, nos interesaba estudiar si los pacientes presentaban alguno de los polimorfismos del gen *ABCC4* que según la literatura afectan la función del transportador MRP4, impactando con esto en la respuesta al tratamiento antiviral. Para ello, se extrajo el ADN de PBMCs de cada paciente y se estudió la presencia de los polimorfismos ya indicados (tabla I2). Como se mencionó anteriormente, en el criterio de selección de los mismos se tomó en cuenta la frecuencia en la que estos polimorfismos aparecen en la población (es decir, se descartaron aquellos que según la bibliografía son muy poco frecuentes) y su potencial importancia clínica debido al efecto en el transporte de sustratos o en la expresión de la proteína y su localización en membrana.

El polimorfismo documentado con mayor frecuencia en las muestras estudiadas fue rs3742106, el cual se detectó en 12 muestras sobre un total de 15, y en dos de ellas en homocigosis, siendo esta proporción llamativamente alta. Este polimorfismo se localiza en la región 3' UTR y ha sido asociado a la eficacia del tratamiento con 5-fluoruracilo/ capecitabina en pacientes con cáncer colorrectal, dado que la expresión del gen *ABCC4* está regulada a través de la unión del miRNA miR-3190-5p al sitio 3' UTR, el cual inhibe la expresión de dicho gen. La capacidad regulatoria de este miRNA se pierde cuando el gen presenta dicha variación, aumentando su expresión y alterando la sensibilidad de las células a la quimioterapia [Chen *et al.*, 2017]. En los casos estudiados en el presente trabajo, la sobre-expresión de MRP4 podría producir un efecto de disminución de la concentración intracelular de los ANs utilizados. Sin embargo, de las muestras en las que se documentó este polimorfismo, sólo en BA8 y JG10 no se detectaron mutaciones virales que dificultaran sacar cualquier conclusión en forma unívoca. En JG10, como ya se mencionó, está presente también otro polimorfismo de *ABCC4*, por lo cual solo se vería el efecto “limpio” de rs3742106 en BA8. Este paciente no había sido tratado con antivirales al momento de tomar la muestra. Lamentablemente, los únicos datos posteriores que tenemos es que se le indicó tratamiento con entecavir, pero no tenemos información acerca de la respuesta al mismo (ya que no volvió a presentarse en el Hospital).

Se documentaron los polimorfismos rs11568658 (Gly187Trp) y rs2274407 (Lys304Asn) en el paciente XK13. De acuerdo a la bibliografía, el primero de ellos está asociado a un aumento en la acumulación intracelular de AZT y Adefovir [Abla *et al.*, 2008]. Sin embargo, en otro trabajo donde se estudiaron pacientes crónicamente infectados con HBV, se ha reportado que este polimorfismo debilitaría la respuesta al tratamiento con ANs como Entecavir y Telvibudine [Wang *et al.*, 2014]. Sumado a esto, en este paciente se detectó la mutación L180M en la polimerasa viral. Dicha mutación está asociada a resistencia a lamivudina, antiviral con el cual fue tratado por 10 años, este hecho es consistente con la aparición de resistencia a dicho fármaco, lo que se verificó en la clínica.

El polimorfismo rs2274407 (Lys304Asn) fue documentado en tres de los pacientes estudiados (JG10, XK13 y CD15), pero en todos los casos acompañado de otro polimorfismo: como ya se mencionó, en XK13 con el polimorfismo rs11568658 (Gly187Trp) y en los pacientes JG10 y CD15 con el polimorfismo rs3742106. Este polimorfismo (rs2274407) también es uno de los más frecuentes en la población [Abla *et al.*, 2008] y se considera de importancia clínica, no tanto por el cambio aminoacídico sino porque a nivel del ARNm está ubicado en un sitio aceptor de *splicing*, excluyéndose el exón 8 y produciendo una proteína con una actividad disminuida respecto de la *wild type* [Tanaka *et al.* 2015, Mesrian Tanha *et al.*, 2017]. Sin embargo, debido a la presencia de otro polimorfismo en los tres casos (y en CD15 además se suma el efecto de la presencia de

mutaciones en la polimerasa viral) no fue posible sacar conclusiones unívocas sobre el efecto de dicho polimorfismo.

Cabe mencionarse que el paciente JG10 no había sido tratado con ANs hasta el momento de la toma de muestra, y no se detectaron mutaciones en la polimerasa viral asociadas a resistencia. Luego, fue medicado con entecavir y presentó carga viral baja (<30 UI/ml) hasta el último control del que tenemos conocimiento (enero de 2015, ya que no continuó el tratamiento en el Hospital). Por lo cual, al menos durante los 3 años de tratamiento de los que tenemos conocimiento, no parece haber influencia de los polimorfismos detectados (rs2274407 y rs3742106) sobre la respuesta al tratamiento con entecavir, aunque no puede descartarse un efecto compensatorio entre ambos.

Cabe aclarar que cuando se comenzó con este estudio en colaboración con el Servicio de Hepatología del Hospital Argerich, se proyectó un caudal de muestras que por distintos motivos no fue alcanzado; siendo el número de muestras de pacientes que ingresaron al laboratorio para su análisis (n=15) mucho menor al planificado. Para soslayar esto se buscó incorporar al estudio muestras de pacientes de otras instituciones, no siendo esto posible debido a que en la mayoría de los casos los pacientes ya habían sido enrolados en otro tipo de estudios (generalmente con laboratorios de desarrollo de fármacos). Es por este motivo que, si bien no era el objetivo inicial, el análisis a partir de las muestras obtenidas es un análisis descriptivo y cualitativo, no cuantitativo.

De esta forma, debido al bajo número de muestras y la baja adherencia al tratamiento y/o controles de los pacientes fue imposible sacar conclusiones unívocas acerca del efecto de los SNPs estudiados sobre la respuesta a la terapéutica. De todos modos, consideramos que sería interesante ampliar el número de muestras incluyendo pacientes de los que pudiera hacerse un seguimiento en el tiempo y en particular, estudiar el efecto del polimorfismo rs3742106, ya que si bien no pudo hacerse un análisis estadístico consideramos que es llamativamente alta la frecuencia documentada en los pacientes aquí estudiados. Estos estudios podrían complementarse con otro tipo de análisis de su efecto *in vitro*.

CONCLUSIONES



*“Cree a aquellos que buscan
la verdad. Duda de los que
la encuentran”*

André Gide

CONCLUSIONES

Del estudio de la regulación de la expresión de transportadores de la familia ABC implicados en el transporte de drogas antivirales por parte del HBV:

- La replicación del HBV no estaría afectando la expresión de BCRP de manera directa.
- La replicación del HBV estaría aumentando la expresión de MRP4 al menos mediante el aumento en la actividad de su promotor, lo que podría conducir a MDR.
- La proteína HBx estimula la expresión de MKP-1 favoreciendo la sobreexpresión de *ABCC4* -por medio de la estabilización y activación de Nrf2- evento que podría conducir a MDR tanto en la terapéutica antiviral como en la anti-neoplásica.

Del desarrollo de estrategias tendientes a optimizar la terapéutica anti-HBV mediante el diseño de formulaciones análogo de nucleósido (AN) -co-polímero:

- Se comprobó la actividad antiviral de un análogo de nucleósido producido por síntesis química.
- El co-polímero F127 no afectó la expresión de las bombas ABC estudiadas.
- El co-polímero F127 presentó una actividad antiviral considerable y demostró un efecto sinérgico al combinarse con el análogo de nucleósido estudiado.

Del análisis del perfil de resistencia a drogas antivirales en pacientes crónicamente infectados con HBV:

- Los genotipos de HBV registrados son los que circulan habitualmente en nuestro país (D, F y C).
- Se documentaron diversas mutaciones asociadas a resistencia a los análogos de nucleósidos lamivudina, adefovir, entecavir y telvibudina.
- Se registró en alta frecuencia el polimorfismo rs3742106 para *ABCC4*.

BIBLIOGRAFÍA



*“Si he visto más lejos es
porque estoy sentado sobre
los hombros de gigantes”.*

Isaac Newton

BIBLIOGRAFÍA

- Abla N, Chinn LW, Nakamura T, Liu L, Huang CC, Johns SJ, Kawamoto M, Stryke D, Taylor TR, Ferrin TE, Giacomini KM, Kroetz DL (2008). The human multidrug resistance protein 4 (MRP4, ABCC4): functional analysis of a highly polymorphic gene. *J Pharmacol Exp Ther* 325(3):859-868.
- Adema AD, Floor K, Smid K, Honeywell RJ, Scheffer GL, Jansen G, Peters GJ (2014). Overexpression of MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5) confer resistance to the nucleoside analogs cytarabine and troxacitabine, but not gemcitabine. *Springerplus* 3:732.
- Alakhov V, Klinski E, Li S, Pietrzynski G, Venne A, Batrakova E, Bronitch T, Kabanov AV (1999). Block copolymer-based formulation of doxorubicin. From cell screen to clinical trials. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 16: 113–134.
- Alakhov V, Moskaleva E, Batrakova EV, Kabanov AV (1996). Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by Pluronic P85 block copolymer. *Bioconjugate Chem* 7: 209–216.
- Alakhova DY, Rapoport NY, Batrakova EV, Timoshin AA, Li S, Nicholls D, Alakhov VY, Kabanov AV (2010). Differential metabolic responses to Pluronic in MDR and non-MDR cells: a novel pathway for chemosensitization of drug resistant cancers. *J Controlled Release* 142: 89–100.
- Alakhova DY, Zhao Y, Li S, Kabanov AV (2013). Effect of doxorubicin/Pluronic SP1049C on tumorigenicity, aggressiveness, DNA methylation and stem cell markers in murine leukemia. *PLoS One* 8(8): 72238.
- Albermann N, Schmitz-Winnenthal FH, Z'graggen K, Volk C, Hoffmann MM, Haefeli WE, Weiss J (2005). Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. *Biochem Pharmacol* 70:949–958.
- Allen JD, Schinkel AH (2002). Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol Cancer Ther* 1(6):427-434.
- Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, Chang G (2009). Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 323: 1718–1722.
- Al-Qahtani AA, Al-Anazi MR, Nazir N, Ghai R, Abdo AA, Sanai FM, Al-Hamoudi WK, Alswat KA, Al-Ashgar HI, Khan MQ, Albenmoussa A, Cruz DD, Bohol MFF, Al-Ahdal MN (2017). Hepatitis B virus (HBV) X gene mutations and their association with liver disease progression in HBV-infected patients. *Oncotarget* 8(62):105115-105125.
- Al-Shawi MK, Polar MK, Omote H, Figler RA (2003). Transition state analysis of the coupling of drug transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein. *J Biol Chem* 278:52629–52640.

- Alvarez-Lorenzo C, Rey-Rico A, Brea J, Loza MI, Concheiro A, Sosnik A (2010). Inhibition of P-glycoprotein pumps by PEO-PPO amphiphiles: branched versus linear derivatives. *Nanomedicine (Lond)* 5: 1371-1383.
- Anderson PL, Lamba J, Aquilante CL, Schuetz E, Fletcher CV (2006). Pharmacogenetic characteristics of indinavir, zidovudine, and lamivudine therapy in HIV-infected adults: a pilot study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 42(4):441-9.
- Annilo T, Chen ZQ, Shulenin S, Costantino J, Thomas L, Lou H, Stefanov S, Dean M (2006). Evolution of the vertebrate ABC gene family: analysis of gene birth and death. *Genomics* 88(1):1-11.
- Assem M, Schuetz EG, Leggas M, Sun D, Yasuda K, Reid G, Zelcer N, Adachi M, Strom S, Evans RM, Moore DD, Borst P, Schuetz JD (2004). Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice. *J Biol Chem* 279:22250-22257.
- Banerjee M, Marensi V, Conseil G, Le XC, Cole SP, Leslie EM (2016). Polymorphic variants of MRP4/ABCC4 differentially modulate the transport of methylated arsenic metabolites and physiological organic anions. *Biochem Pharmacol* 120:72-82.
- Base de datos *dbSNP database* (2018). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>
- Batrakova E, Lee S, Li S, Venne A, Alakhov V, Kabanov A (1999). Fundamental relationships between the composition of pluronic block copolymers and their hypersensitization effect in MDR cancer cells. *Pharm Res* 16:1373-1379.
- Batrakova E, Li S, Miller D, Kabanov A (1999). Pluronic P85 increases permeability of a broad spectrum of drugs in polarized BBMEC and Caco-2 cell monolayers. *Pharm Res* 16:1366-1372.
- Batrakova E, Li S, Vinogradov S, Alakhov V, Miller D, Kabanov A (2001a). Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. *J Pharmacol Exp Ther* 299:483-493.
- Batrakova E, Miller D, Li S, Alakhov V, Kabanov A, Elmquist W (2001c). Pluronic P85 enhances the delivery of digoxin to the brain: in vitro and in vivo studies. *J Pharmacol Exp Ther* 296:551-557.
- Batrakova EV, Kabanov AV (2008). Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Controlled Release* 130: 98-106.
- Batrakova EV, Kelly DL, Li S, Li Y, Yang Z, Xiao L, Alakhova DY, Sherman S, Alakhov VY, Kabanov AV (2006). Alteration of genomic responses to doxorubicin and prevention of MDR in breast cancer cells by a polymer excipient: pluronic P85. *Mol Pharm* 3:113-123.
- Batrakova EV, Li S, Alakhov VY, Elmquist WF, Miller DW, Kabanov AV (2003). Sensitization of cells overexpressing multidrug-resistant proteins by pluronic P85. *Pharm Res* 20: 1581-1590.

- Batrakova EV, Li S, Elmquist WF, Miller DW, Alakhov VY, Kabanov AV (2001b). Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by pluronic block copolymers: selective energy depletion. *Br J Cancer* 85:1987–1997.
- Batrakova EV, Li S, Li Y, Alakhov VY, Kabanov A (2004). Effect of pluronic P85 on ATPase activity of drug efflux transporters. *Pharm Res* 21:2226–2233.
- Belkahla S, Haq Khan AU, Gitenay D, Alexia C, Gondeau C, Vo DN, Orecchioni S, Talarico G, Bertolini F, Cartron G, Hernandez J, Daujat-Chavanieu M, Allende-VegaN, Gonzalez MV (2017). Changes in metabolism affect expression of ABC transporters through ERK5 and depending on p53 status. *Oncotarget* 9(1):1114–1129.
- Bloom K, Maepa MB, Ely A, Arbuthnot P (2018). Gene therapy for chronic HBV- Can we eliminate cccDNA? *Genes (Basel)* 9(4):207.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 92 (16): 1295–1302.
- Bouchard MJ, Schneider RJ (2004). The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J Virol* 78(23):12725–12734.
- Boumendjel A, Baubichon-Cortay H, Trompier D, Perrotton T, Di Pietro A (2005). Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: recent advances in the discovery of reversal agents. *Med Res Rev* 25 (4): 453–472.
- Bröderdorf S, Zang S, Schaletzki Y, Grube M, Kroemer HK, Jedlitschky G (2014). cAMP regulates expression of the cyclic nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) through the EPAC pathway. *Pharmacogenet Genomics* 24:522–526.
- Burk O, Arnold KA, Geick A, Tegude H, Eichelbaum M (2005). A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR1 expression. *Biol Chem* 386:503–513.
- Carozzo A, Diez F, Gomez N, Cabrera M, Shayo C, Davio C, Fernández N (2015). Dual role of cAMP in the transcriptional regulation of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *PLoS One* 10: e0120651.
- Castronuovo, CC. Análisis de las Bases Moleculares de la Resistencia a la Quimioterapia y Estrategias para su Optimización: Rol de las Proteínas ABC, la Apoptosis y la Transformación Celular. *Tesis doctoral presentada en Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA*. Diciembre, 2015.
- Ceballos MP, Rigalli JP, Cere LI, Semeniuk M, Catania VA, Ruiz ML (2018). ABC transporters: Regulation and association with multidrug resistance in hepatocellular carcinoma and colorectal carcinoma. *Curr Med Chem* doi: 10.2174/0929867325666180105103637.
- Cha MH, Choi J, Choi BG, Park K, Kim IH, Jeong B, Han DK (2011). Synthesis and characterization of novel thermo-responsive F68 block copolymers with cell-adhesive RGD peptide. *J Colloid Interface Sci* 360: 78–85.

- Chan GNY, Hoque MT, Cummins CL, Bendayan R (2011). Regulation of P-glycoprotein by orphan nuclear receptors in human brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem* 118:163–175.
- Chen BF (2018). Hepatitis B virus pre-S/S variants in liver diseases. *World J Gastroenterol* 24(14):1507-1520
- Chen Q, Meng F, Wang L, Mao Y, Zhou H, Hua D, Zhang H, Wang W (2017). A polymorphism in ABCC4 is related to efficacy of 5-FU/capecitabine-based chemotherapy in colorectal cancer patients. *Sci Rep* 7(1):7059.
- Ci L, Kusuhara H, Adachi M, Schuetz JD, Takeuchi K, Sugiyama Y (2007). Involvement of MRP4 (ABCC4) in the luminal efflux of ceftizoxime and cefazolin in the kidney. *Mol Pharmacol* 71:1591–1597.
- Cisternino S, Mercier C, Bourasset F, Roux F, Scherrmann JM (2004). Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res* 64(9):3296-3301.
- Coffin CS, Mulrooney-Cousins PM, Peters MG, van Marle G, Roberts JP, Michalak TI, Terrault NA (2011). Molecular characterization of intrahepatic and extrahepatic hepatitis B virus (HBV) reservoirs in patients on suppressive antiviral therapy. *J Viral Hepat* 18(6):415-423.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650–1654.
- Cole SP, Deeley RG (1998). Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* 20 (11): 931-940.
- Cuestas, ML. Estudios de Genómica funcional del Virus Hepatitis B. *Tesis doctoral presentada en Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*. Marzo, 2010.
- Cuestas ML, Castillo AI, Sosnik A, Mathet VL (2012). Downregulation of *mdr1* and *abcg2* genes is a mechanism of inhibition of efflux pumps mediated by polymeric amphiphiles. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 6577–6579.
- Cuestas ML, Sosnik A, Mathet VL (2011). Poloxamines display a multiple inhibitory activity of ATP-binding cassette (ABC) transporters in cancer cell lines. *Mol Pharm* 8: 1152-1164.
- Dassa E, Bouige P (2001). The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res Microbiol* 152(3-4): 211-229.
- Davidson AL, Chen J (2004). ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* 73:241-268.
- Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42 (7): 1007-1017.
- Delfino CM, Berini C, Pedrozo W, Malan R, Blejer J, Oubiña JR, Biglione MM, Mathet VL (2015). First hepatitis B virus full-length genomic study among

- blood donors from Argentina: unexpected mutations in the circulating subgenotypes' proteins. *Virus Genes* 50(2):286-291.
- Dembek C, Protzer U, Roggendorf M (2018). Overcoming immune tolerance in chronic hepatitis B by therapeutic vaccination. *Curr Opin Virol* 30:58-67.
 - Didziapetris R, Japertas P, Avdeef A, Petrauskas A (2003). Classification analysis of P-glycoprotein substrate specificity. *J Drug Targeting* 11: 391-406.
 - Diestra JE, Scheffer GL, Catala I, Maliepaard M, Schellens JH, Scheper RJ, Germa-Lluch JR, Izquierdo MA (2002). Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *J Pathol* 198(2):213-219.
 - Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15665-15670.
 - El-Sheikh AA, van den Heuvel JJ, Krieger E, Russel FG, Koenderink JB (2008). Functional role of arginine 375 in transmembrane helix 6 of multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4). *Mol Pharmacol* 74:964-971.
 - European Association for the Study of the Liver (2017). EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 67(2):370-398.
 - Faure-Dupuy S, Lucifora J, Durantel D (2017). Interplay between the Hepatitis B Virus and innate immunity: from an understanding to the development of therapeutic concepts. *Viruses* 9(5):95.
 - Feitelson, MA (2006). Parallel epigenetic changes in the pathogenesis of hepatitis virus-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 239(1):10-20.
 - Ferrari C (2015). HBV and the immune response. *Liver Int* 35(1):121-128.
 - Frisman I, Seliktar D, Bianco-Peled H (2011). Nanostructuring PEG-fibrinogen hydrogels to control cellular morphogenesis. *Biomaterials* 32: 7839-7846.
 - Frisman I, Seliktar D, Bianco-Peled H (2012). Nanostructuring biosynthetic hydrogels for tissue engineering: a cellular and structural analysis. *Acta Biomater* 8: 51-60.
 - Fu S, Zhou RR, Li N, Huang Y, Fan XG (2016). Hepatitis B virus X protein in liver tumor microenvironment. *Tumour Biol* 37:15371-15381.
 - Fukuda Y, Schuetz JD (2012). ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance. *Biochem Pharmacol* 83:1073-1083.
 - Fukumoto M (2004). Single-photon agents for tumor imaging: 201Tl, 99mTc-MIBI, and 99mTc-tetrofosmin. *Ann Nucl Med* 18:79-95.
 - Gameiro M, Silva R, Rocha-Pereira C, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML, Remião F (2017). Cellular Models and In Vitro Assays for the Screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP. *Molecules* 22(4). pii: E600. doi: 10.3390/molecules22040600.

- Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature* 526(7571):68–74.
- Gong J, Jaiswal R, Mathys JM, Combes V, Grau GE, Bebawy M (2012). Microparticles and their emerging role in cancer multidrug resistance. *Cancer Treat Rev* 38 (3): 226-234.
- Gong J, Liu X (2018). Effect of HBIG combined with hepatitis B vaccine on blocking HBV transmission between mother and infant and its effect on immune cells. *Exp Ther Med* 15(1):919-923.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2 (1): 48-58.
- Gradhand U, Lang T, Schaeffeler E, Glaeser H, Tegude H, Klein K, Fritz P,
- Gu DH, Zhu YZ, Wang X, Bai ZC, Ping JL, Chen Q, Zhu R (2013). Correlation between androgen receptor expression and hepatitis B virus X protein and its clinical significance in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 35(4) [Abstract].
- Guan J, Chen XP, Zhu H, Luo SF, Cao B, Ding L (2004). Involvement of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway in multidrug resistance induced by HBx in hepatoma cell line. *World J Gastroenterol.* 10(23):3522-3527.
- Guan Y, Huang J, Zuo L, Xu J, Si L, Qiu J, Li G (2011). Effect of Pluronic P123 and F127 block copolymer on P-glycoprotein transport and CYP3A metabolism. *Arch Pharm Res* 34: 1719–1728.
- Hayashi H, Naoi S, Nakagawa T, Nishikawa T, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Kondo A, Kubo K, Yabuki T, Hattori A, Hirouchi M, Sugiyama Y (2012). Sorting nexin 27 interacts with multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) and mediates internalization of MRP4. *J Biol Chem* 287:15054–15065.
- Hino O, Shows TB, Rogler CE (1986). Hepatitis B virus integration site in hepatocellular carcinoma at chromosome 17;18 translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(21):8338-8342.
- Hira D, Terada T (2018). BCRP/ABCG2 and high-alert medications: biochemical, pharmacokinetic, pharmacogenetic, and clinical implications. *Biochem Pharmacol* 147:201-210.
- Hong W, Chen D, Zhang X, Zeng J, Hu H, Zhao X, Qiao M (2013). Reversing multidrug resistance by intracellular delivery of Pluronic(R) P85 unimers. *Biomaterials* 34: 9602–9614.
- Honorat M, Mesnier A, Di Pietro A, Lin V, Cohen P, Dumontet C, Payen L (2008). Dexamethasone down-regulates ABCG2 expression levels in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 375:308–314.

- Hoque MT, Cole SP (2008). Down-regulation of Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 increases expression and function of multidrug resistance protein 4. *Cancer Res* 68:4802–4809.
- Hung JH, Teng YN, Wang LH, Su IJ, Wang CC, Huang W, Lee KH, Lu KY, Wang LH (2011). Induction of Bcl-2 expression by hepatitis B virus pre-S2 mutant large surface protein resistance to 5-fluorouracil treatment in Huh-7 cells. *PLoS One* 6(12):e28977.
- Huynh T, Norris MD, Haber M, Henderson MJ (2012). ABCC4/MRP4: a MYCN-regulated transporter and potential therapeutic target in neuroblastoma. *Front Oncol* 2:178.
- Ilan Y, Galun E, Nagler A, Baruch Y, Livni N, Tur-Kaspa R (1996). Sanctuary of hepatitis B virus in bone-marrow cells of patients undergoing liver transplantation. *Liver Transpl Surg* 2(3):206-210.
- Ishikawa T, Nakagawa H (2009). Human ABC transporter ABCG2 in cancer chemotherapy and pharmacogenomics. *J Exp Ther Oncol* 8(1): 5-24.
- Iwano S, Ichikawa M, Takizawa S, Hashimoto H, Miyamoto Y (2010). Identification of AhR-regulated genes involved in PAH-induced immunotoxicity using a highly-sensitive DNA chip, 3D-Gene Human Immunity and Metabolic Syndrome 9k. *Toxicol In Vitro* 24(1):85–91.
- Janke D, Mehralivand S, Strand D, Gödtel-Armbrust U, Habermeier A, Gradhand U, Fischer C, Toliat MR, Fritz P, Zanger UM, Schwab M, Fromm MF, Nürnberg P, Wojnowski L, Closs EI, Lang T (2008). 6-mercaptopurine and 9-(2-phosphonyl-methoxyethyl) adenine (PMEA) transport altered by two missense mutations in the drug transporter gene ABCC4. *Hum Mutat* 29(5):659-669.
- Jedlitschky G, Kroemer HK, Bachmakov I, Anwald B, Kerb R, Zanger UM, Eichelbaum M, Schwab M, Fromm MF (2008). Variability in human hepatic MRP4 expression: influence of cholestasis and genotype. *Pharmacogenomics J* 8:42–52.
- Jedlitschky G, Tirschmann K, Lubenow LE, Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Greinacher A, Kroemer HK (2004). The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage. *Blood* 104:3603–3610.
- Ji M, Hu K (2017). Recent advances in the study of hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *Virol Sin* 32(6):454-464.
- Jonker JW, Merino G, Musters S, van Herwaarden AE, Bolscher E, Wagenaar E, Mesman E, Dale TC, Schinkel AH (2005). The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat Med* 11(2):127-129.
- Jouan E, Le Vée M, Denizot C, Parmentier Y, Fardel O (2016). Drug Transporter Expression and Activity in Human Hepatoma HuH-7 Cells. *Pharmaceutics* 9(1):3.

- Juliano RL, Ling V (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455: 152–162.
- Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY (2002). Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 759-779.
- Kang KW, Im YB, Go WJ, Han HK (2009). c-Myc amplification altered the gene expression of ABC- and SLC-transporters in human breast epithelial cells. *Mol Pharm* 6:627–633.
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS (2003). Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 124(2):327-334.
- Keppler D (2017). Progress in the molecular characterization of hepatobiliary transporters. *Dig Dis* 35:197–202.
- Kim H, Lee SA, Do SY, Kim BJ (2016). Precore/core region mutations of hepatitis B virus related to clinical severity. *World J Gastroenterol* 22(17):4287-4296.
- Kim H, Lee SA, Kim BJ (2016). X region mutations of hepatitis B virus related to clinical severity. *World J Gastroenterol* 22(24):5467-5478.
- Knowles BB, Howe CC, Aden DP (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209: 497-499.
- Komori H, Yamada K, Tamai I (2018). Hyperuricemia enhances intracellular urate accumulation via down-regulation of cell-surface BCRP/ABCG2 expression in vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1860(5):973-980.
- Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F, Borst P (1997). Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 57(16):3537–3547.
- Krishnamurthy P, Schwab M, Takenaka K, Nachagari D, Morgan J, Leslie M, Du W, Boyd K, Cheok M, and Nakauchi H, Marzolini C, Kim RB, Poonkuzhali B, Schuetz E, Evans W, Relling M, Schuetz JD (2008). Transporter-mediated protection against thiopurine-induced hematopoietic toxicity. *Cancer Res* 68:4983–4989.
- La Fauci V, Riso R, Facciola A, Ceccio C, Lo Giudice D, Calimeri S, Squeri R (2016). Response to anti-HBV vaccine and 10-year follow-up of antibody levels in Health care workers. *Public Health* 139:198-202.
- Lee K, Klein-Szanto AJ, Kruh GD (2000). Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells. *J Natl Cancer Inst* 92:1934–1940.
- Li J, Xu Z, Zheng Y, Johnson DL, Ou JH (2002). Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 activity by wild-type and mutant hepatitis B virus X proteins. *J Virol* 76:5875-5881.

- Li X, Chen D, Le C, Zhu C, Gan Y, Hovgaard L, Yang M (2011). Novel mucus-penetrating liposomes as a potential oral drug delivery system: preparation, in vitro characterization, and enhanced cellular uptake. *Int J Nanomed* 6: 3151–3162.
- Lin CL, Kao JH (2018). Review article: the prevention of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 48(1):5-14.
- Lin S, Zhang YJ (2017). Interference of Apoptosis by Hepatitis B Virus. *Viruses* 9(8):230.
- Lindh M, Andersson AS, Gusdal A (1997). Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus: Large-scale analysis using a new genotyping method. *J Inf Dis* 175: 1285-1293.
- Liu FS (2009). Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy-a quick review. *Taiwan J Obstet Gynecol* 48(3):239-244.
- Liu S, Koh SS, Lee CG (2016). Hepatitis B Virus X Protein and Hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Sci* 17(6):940.
- Liu Y, Lou G, Wu W, Shi Y, Zheng M, Chen Z (2013). Interferon- α sensitizes HBx-expressing hepatocarcinoma cells to chemotherapeutic drugs through inhibition of HBx-mediated NF- κ B activation. *Virol J* 10:168.
- López JL, Mathet VL, Oubiña JR, Campos RH (2007). Intrahost evolution of HBe antigen-negative hepatitis B virus genomes ascribed to the F genotype: a longitudinal 3-year retrospective study. *Journal of General Virology* 88: 86–91.
- López JL, Mbayed VA, Telenta PFS, González JE, Campos RH (2002). 'Hbe minus' mutants of hepatitis B virus. Molecular characterization and its relation to viral genotypes. *Virus Research* 87: 41–49.
- Luo L, Chen Y, Wang H, Wang S, Liu K, Li X, Wang XJ, Tang X (2018). Mkp-1 protects mice against toxin-induced liver damage by promoting the Nrf2 cytoprotective response. *Free Radic Biol Med*. 115:361-370.
- Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH (2001). Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 61(8):3458-3464.
- Mani SKK, Andrisani O (2018). Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma and Hepatic Cancer Stem Cells. *Genes (Basel)* 9(3): 137.
- Mathet VL, López JL, Ruiz V, Sánchez DO, Carballal G, Campos RH, Oubiña JR (2007). Dynamics of a hepatitis B virus e antigen minus population ascribed to genotype F during the course of a chronic infection despite the presence of anti-HBs antibodies. *Virus Research* 123: 72–85.
- McIlroy D, Barteau B, Cany J, Richard P, Gourden C, Conchon S, Pitard B (2009). DNA/amphiphilic block copolymer nanospheres promote low-dose DNA vaccination. *Mol Ther* 17:1473-1481.
- Mele A, Offidani M, Visani G, Marconi M, Cambioli F, Nonni M, Catarini M, Brianzoni E, Berbellini A, Ascoli G, Brunori M, Agostini V, Corvatta L, Isidori A,

- Spinelli A, Gradari M, Leoni P (2007). Technetium-99m sestamibi scintigraphy is sensitive and specific for the staging and the follow-up of patients with multiple myeloma: a multicentre study on 397 scans. *Br J Haematol* 136:729–735.
- Mesrian Tanha H, Rahgozar S, Mojtavavi Naeini M (2017). ABCC4 functional SNP in the 3' splice acceptor site of exon 8 (G912T) is associated with unfavorable clinical outcome in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 80(1):109-117.
 - Miller D, Batrakova E, Waltner T, Alakhov V, Kabanov A (1997). Interactions of pluronic block copolymers with brain microvessel endothelial cells: evidence of two potential pathways for drug absorption. *Bioconjug Chem* 8:649–657.
 - Minami M, Daimon Y, Mori K, Takashima H, Nakajima T, Itoh Y, Okanoue T (2005). Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis in chronic hepatitis B patients as an early drastic genetic change leading to hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 24(27):4340-4348.
 - Minor MM, Slagle BL (2014). Hepatitis B virus HBx protein interactions with the ubiquitin proteasome system. *Viruses* 6(11):4683-4702.
 - Moffit JS, Aleksunes LM, Maher JM, Scheffer GL, Klaassen CD, Manautou JE (2006). Induction of hepatic transporters multidrug resistance-associated proteins (Mrp) 3 and 4 by clofibrate is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Pharmacol Exp Ther* 317:537–545.
 - Mohammad IS, He W, Yin L (2018). Understanding of human ATP binding cassette superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR. *Biomed Pharmacother* 100:335-348.
 - Mottino AD, Hoffman T, Jennes L, Vore M (2000). Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 293(3):717-723.
 - Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42(9):3858-3863.
 - Nakanishi T, Ross DD (2012). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin J Cancer*. 31(2):73-99.
 - Naspinski C, Gu X, Zhou GD, Mertens-Talcott SU, Donnelly KC, Tian Y (2008). Pregnane X receptor protects HepG2 cells from BaP-induced DNA damage. *Toxicol Sci* 104:67–73.
 - Neuveut C, Wei Y, Buendia MA (2010). Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 52(4):594-604.
 - Ng IO, Liu CL, Fan ST, Ng M (2000). Expression of P-glycoprotein in hepatocellular carcinoma. A determinant of chemotherapy response. *Am J Clin Pathol* 113 (3): 355-363.

- Norris MD, Bordow SB, Haber PS, Marshall GM, Kavallaris M, Madafiglio J, Cohn SL, Salwen H, Schmidt ML, Hipfner DR, Cole SP, Deeley RG, Haber M (1997). Evidence that the MYCN oncogene regulates MRP gene expression in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 33: 1911–1916.
- Norris MD, Bordow SB, Marshall GM, Haber PS, Cohn SL, Haber M (1996). Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 334:231–238.
- Organización Mundial de la Salud- Sitio oficial (2017). Hepatitis B. Tomado de: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
- Ozvegy-Laczka C, Cserepes J, Elkind NB, Sarkadi B (2005). Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. *Drug Resist Updat* 8(1-2):15-26.
- Park J, Kwak JO, Riederer B, Seidler U, Cole SP, Lee HJ, Lee MG (2014). Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 3 is critical for multidrug resistance protein 4-mediated drug efflux in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 25:726–736.
- Peña-Solórzano D, Stark SA, König B, Sierra CA, Ochoa-Puentes C (2017). ABCG2/BCRP: Specific and Nonspecific Modulators. *Med Res Rev* 37(5):987-1050.
- Pisano MB, Blanco S, Carrizo H, Ré VE, Gallego S (2016). Hepatitis B virus infection in blood donors in Argentina: prevalence of infection, genotype distribution and frequency of occult HBV infection. *Arch Virol* 161(10):2813-2817.
- Pollicino T, Cacciola I, Saffioti F, Raimondo G (2014). Hepatitis B virus PreS/S gene variants: pathobiology and clinical implications. *J Hepatol* 61(2):408-17.
- Porro A, Iraci N, Soverini S, Diolaiti D, Gherardi S, Terragna C, Durante S, Valli E, Kalebic T, Bernardoni R, Perrod C, Haber M, Norris MD, Baccarani M, Martinelli G, Perini G(2011). c-MYC oncoprotein dictates transcriptional profiles of ATP-binding cassette transporter genes in chronic myelogenous leukemia CD341 hematopoietic progenitor cells. *Mol Cancer Res* 9:1054–1066.
- Pradhan M, Bembinster LA, Baumgarten SC, Frasor J (2010). Proinflammatory cytokines enhance estrogen-dependent expression of the multidrug transporter gene ABCG2 through estrogen receptor and NF-κB cooperativity at adjacent response elements. *J Biol Chem* 285:31100–31106.
- Qiu L, Wang T, Xu X, Wu Y, Tang Q, Chen K (2017). Long Non-Coding RNAs in Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma: Regulation, Functions, and Underlying Mechanisms. *Int J Mol Sci* 18(12): 2505.
- Rajoriya N, Combet C, Zoulim F, Janssen HLA (2017). How viral genetic variants and genotypes influence disease and treatment outcome of chronic hepatitis B. Time for an individualised approach? *J Hepatol* 67(6): 1281–1297.
- Ravna AW, Sager G (2008). Molecular model of the outward facing state of the human multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4). *Bioorg Med Chem Lett* 18:3481–3483.

- Ray AS, Cihlar T, Robinson KL, Tong L, Vela JE, Fuller MD, Wieman LM, Eisenberg EJ, Rhodes GR (2006). Mechanism of active renal tubular efflux of tenofovir. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3297–3304.
- Renga B, Migliorati M, Mencarelli A, Cipriani S, D'Amore C, Distrutti E, Fiorucci S (2011). Farnesoid X receptor suppresses constitutive androstane receptor activity at the multidrug resistance protein-4 promoter. *Biochim Biophys Acta* 809(3):157-165.
- Revill P, Locarnini S (2016). Antiviral strategies to eliminate hepatitis B virus covalently closed circular DNA (cccDNA). *Curr Opin Pharmacol* 30:144-150.
- Rey-Rico A, Cucchiaroni M (2018). PEO-PPO-PEO Tri-Block Copolymers for Gene Delivery Applications in Human Regenerative Medicine-An Overview. *Int J Mol Sci* 19: 775-790.
- Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Keppler D (2008). ATP-dependent transport of leukotrienes B4 and C4 by the multidrug resistance protein ABCC4 (MRP4). *J Pharmacol Exp Ther* 324:86–94.
- Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo AT, Bates SE, Gottesman MM (2018). Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer* [Epub ahead of print] DOI: 10.1038/s41568-018-0005-8.
- Robey RW, Polgar O, Deeken J, To KW, Bates SE (2007). ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 26: 39–57.
- Rogler CE, Sherman M, Su CY, Shafritz DA, Summers J, Shows TB, Henderson A, Kew M (1985). Deletion in chromosome 11p associated with a hepatitis B integration site in hepatocellular carcinoma. *Science* 230(4723):319-322.
- Romsicki Y, Sharom FJ (1999). The membrane lipid environment modulates drug interactions with the P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemistry* 38:6887–6896.
- Russel FG, Koenderink JB, Masereeuw R (2008). Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends Pharmacol Sci* 29:200–207.
- Sahay G, Batrakova EV, Kabanov AV (2008). Different internalization pathways of polymeric micelles and unimers and their effects on vesicular transport. *Bioconjug Chem* 19(10):2023-2029.
- Sandez-Macho I, Casas M, Lage EV, Rial-Hermida MI, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C (2015). Interaction of poloxamine block copolymers with lipid membranes: Role of copolymer structure and membrane cholesterol content. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 133:270-277.
- Sauna ZE, Nandigama K, Ambudkar SV (2004). Multidrug resistance protein 4 (ABCC4)-mediated ATP hydrolysis: effect of transport substrates and characterization of the post-hydrolysis transition state. *J Biol Chem* 279:48855–48864.
- Schaedler S, Krause J, Himmelsbach K, Carvajal-Yepes M, Lieder F, Klingel K, Nassal M, Weiss TS, Werner S, Hildt E (2010). Hepatitis B virus induces

- expression of antioxidant response element-regulated genes by activation of Nrf2. *J Biol Chem* 285(52):41074-41086.
- Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas RV, Kumar A, Fridland A (1999). MRP4: a previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med* 5: 1048-1051.
 - Sharma AK, Zhang L, Li S, Kelly DL, Alakhov VY, Batrakova EV, Kabanov AV (2008). Prevention of MDR development in leukemia cells by micelle-forming polymeric surfactant. *J Control Release*. 131(3):220-227.
 - Siddiqui ZI, Farooqui SR, Azam SA, Afroz M, Wajid S, Parveen S, Kazim SN (2017). A comparative study of hepatitis B virus X protein mutants K130M, V131I and KV130/131MI to investigate their roles in fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* 24(12):1121-1131.
 - Singh A, Wu H, Zhang P, Happel C, Ma J, Biswal S (2010). Expression of ABCG2 (BCRP) is regulated by Nrf2 in cancer cells that confers side population and chemoresistance phenotype. *Mol Cancer Ther* 9:2365-2376.
 - Slagle BL, Bouchard MJ (2018). Role of HBx in hepatitis B virus persistence and its therapeutic implications. *Curr Opin Virol* 30:32-38
 - Sodani K, Patel A, Kathawala RJ, Chen Z-S (2012). Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin J Cancer* 31: 58.
 - Sun D, Zhu L, Yao D, Chen L, Fu L, Ouyang L (2018). Recent progress in potential anti-hepatitis B virus agents: structural and pharmacological perspectives. *Eur J Med Chem* 147:205-217.
 - Sureau C, Romet-Lemonne JL, Mullins JI, Essex M (1986). Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell* 47(1):37-47.
 - Szákacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5(3): 219-234.
 - Sztatmari I, Vamosi G, Brazda P, Balint BL, Benko S, Szeles L, Jeney V, Ozvegy-Laczka C, Szántó A, Barta E, Balla J, Sarkadi B, Nagy L (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells. *J Biol Chem* 281:23812-23823.
 - Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30(12):2725-2729.
 - Tanaka Y, Manabe A, Fukushima H, Suzuki R, Nakadate H, Kondoh K, Nakamura K, Koh K, Fukushima T, Tsuchida M, Koike K, Kiyokawa N, Noguchi E, Sumazaki R, Komiyama T (2015). Multidrug resistance protein 4 (MRP4) polymorphisms impact the 6-mercaptopurine dose tolerance during maintenance therapy in Japanese childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J* 15(4):380-384.

- Tang L, Zhao Q, Wu S, Cheng J, Chang J, Guo JT (2017). The current status and future directions of hepatitis B antiviral drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 12(1):5-15.
- Thomas C, Tampé R (2018). Multifaceted structures and mechanisms of ABC transport systems in health and disease. *Curr Opin Struct Biol* 51:116-128.
- To KK, Robey R, Zhan Z, Bangiolo L, Bates SE (2011). Upregulation of ABCG2 by romidepsin via the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Mol Cancer Res* 9:516-527.
- Tompkins LM, Li H, Li L, Lynch C, Xie Y, Nakanishi T, Ross DD, Wang H (2010). A novel xenobiotic responsive element regulated by aryl hydrocarbon receptor is involved in the induction of BCRP/ABCG2 in LS174T cells. *Biochem Pharmacol* 80(11):1754-1761
- Tong S, Li J, Wands JR, Wen YM (2013). Hepatitis B virus genetic variants: biological properties and clinical implications. *Emerg Microbes Infect* 2(3):e10.
- Ugglä B, Stahl E, Wagsäter D, Paul C, Karlsson MG, Sirsjo A, Tidefelt U (2005). BCRP mRNA expression v. clinical outcome in 40 adult AML patients. *Leuk Res* 29(2):141-146.
- Urquhart BL, Tirona RG, Kim RB (2007). Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs. *J Clin Pharmacol* 47:566-578.
- van Aubel RA, Smeets PH, Peters JG, Bindels RJ, Russel FG (2002). The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J Am Soc Nephrol* 13:595-603.
- Venne A, Li S, Mandeville R, Kabanov A, Alakhov V (1996). Hypersensitizing effect of pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells. *Cancer Res* 56:3626-3629.
- Vlaming ML, Lagas JS, Schinkel AH (2009). Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice. *Adv Drug Deliv Rev* 61(1):14-25.
- Wang WZ, Lu LX, Li DJ, Lu JJ, He M, Liu C, Tang H, Wang LC (2014). Effect of human concentration nucleoside transporters 1 and multi-drug resistance protein 4 gene polymorphism on response of chronic hepatitis B to nucleoside analogues treatment. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 45(6):950-955 [Abstract].
- Wang Z, Wu Z, Huang P (2017). The function of miRNAs in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein. *Oncol Rep* 38(2):652-664.
- Wang Z, Xu Y, Meng X, Watari F, Liu H, Chen X (2015). Suppression of c-Myc is involved in multi-walled carbon nanotubes' down-regulation of ATP-binding

- cassette transporters in human colon adenocarcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 282:42–51.
- Wei KP, Zhu FC, Liu JX, Yan L, Lu Y, Zhai XJ, Chang ZJ, Zeng Y, Li J, Zhuang H (2018). The efficacy of two different dosages of hepatitis B immunoglobulin combined with hepatitis B vaccine in preventing mother-to-child transmission of hepatitis B virus: a prospective cohort study. *Vaccine* 36(2):256–263.
 - Wen J, Luo J, Huang W, Tang J, Zhou H, Zhang W (2015). The Pharmacological and Physiological Role of Multidrug-Resistant Protein 4. *J Pharmacol Exp Ther* 354(3):358–375.
 - Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, de Haas M, Scheffer GL, Baas F, Beijnen JH, Scheper RJ, Hatse S, De Clercq E, Balzarini J, Borst P (2000). Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(13):7476–7481.
 - Wilson-Welder JH, Torres MP, Kipper MJ, Mallapragada SK, Wannemuehler MJ, Narasimhan B (2009). Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. *J Pharm Sci* 98: 1278–1316.
 - Wong CM, Tsang FH, Ng IO (2018). Non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma: molecular functions and pathological implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15(3):137–151.
 - Xu S, Weerachayaphorn J, Cai SY, Soroka CJ, Boyer JL (2010). Aryl hydrocarbon receptor and NF-E2-related factor 2 are key regulators of human MRP4 expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299:G126–G135.
 - Yamada A, Maeda K, Kamiyama E, Sugiyama D, Kondo T, Shiroyanagi Y, Nakazawa H, Okano T, Adachi M, Schuetz JD, Adachi Y, Hu Z, Kusuvara H, Sugiyama Y (2007). Multiple human isoforms of drug transporters contribute to the hepatic and renal transport of olmesartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT1-receptor. *Drug Metab Dispos* 35: 2166–2176.
 - Yang Z, Zhu J, Sriadibhatla S, Gebhart C, Alakhov V, Kabanov A (2005). Promoter- and strain-selective enhancement of gene expression in a mouse skeletal muscle by a polymer excipient Pluronic P85. *J Control Release* 108: 496–512.
 - Yoh K, Ishii G, Yokose T, Minegishi Y, Tsuta K, Goto K, Nishiwaki Y, Kodama T, Suga M, Ochiai A (2004). Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10(5):1691–1697.
 - Yoo J, Hann HW, Coben R, Conn M, DiMarino AJ (2018). Update treatment for HBV infection and persistent risk for hepatocellular carcinoma: prospect for an HBV cure. *Diseases* 6(2):27.
 - Zaki NM (2014). Augmented cytotoxicity of hydroxycamptothecin-loaded nanoparticles in lung and colon cancer cells by chemosensitizing pharmaceutical excipients. *Drug Delivery* 21 (4): 265–275.
 - Zeng GB, Wen SJ, Wang ZH, Yan L, Sun J, Hou JL (2004). A novel hepatitis B virus genotyping system by using restriction

- fragment length polymorphism patterns of S gene amplicons. *World J Gastroenterol* 10(21):3132-3136.
- Zhang ZH, Wu CC, Chen XW, Li X, Li J, Lu MJ (2016). Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis. *World J Gastroenterol* 22(1):126-144.
 - Zhao Y, Alakhova DY, Kabanov AV (2013). Can nanomedicines kill cancer stem cells? *Adv Drug Delivery Rev* 65 (13-14): 1763-1783.
 - Zhao Y, Alakhova DY, Kim JO, Bronich TK, Kabanov AV (2013). A simple way to enhance Doxil(R) therapy: drug release from liposomes at the tumor site by amphiphilic block copolymer. *J Controlled Release* 168: 61-69.
 - Zhu R, Zhang JS, Zhu YZ, Fan J, Mao Y, Chen Q, Zhu HG (2011). HBx-induced androgen receptor expression in HBV-associated hepatocarcinoma is independent of the methylation status of its promoter. *Histol Histopathol* 26(1):23-35.
 - Zoulim F, Locarnini S (2012). Management of treatment failure in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 56:S112-22.