



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Tesis para optar al título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

**MUTACIONES K130M V131I EN EL PROTEÍNA X DEL VIRUS DE LA  
HEPATITIS B Y SUS IMPLICANCIAS EN LOS MECANISMOS DE  
PATOGENIA DE LA INFECCIÓN CRÓNICA**

**Lic. María Mercedes Elizalde**

**Año 2015**

Director de Tesis: Dra. Luciana Barbini

Consejero de estudios: Dr. Diego Flichman

Área: Virología

Lugar de realización: Cátedra de Virología. Facultad de Farmacia y Bioquímica.  
Universidad de Buenos Aires

La Dra. Luciana Barbini Profesora Adjunta de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Mar del Plata e Investigadora Adjunta del CONICET y el Dr. Diego Flichman Profesor Adjunto de la Cátedra de Virología del Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires e Investigador Independiente del CONICET

#### CERTIFICAN

Que la presente tesis doctoral titulada “Mutaciones K130M V131I en la proteína X del virus de la hepatitis B y sus implicancias en los mecanismos de patogenia de la infección crónica” ha sido realizada por la Licenciada en Ciencias Biológicas María Mercedes Elizalde bajo su dirección, en la Cátedra de Virología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, y que hallándose concluída y considerándola en condiciones para optar al título de Doctor, autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Para que así conste, se firma el presente certificado en noviembre de 2015.

Dra. Luciana Barbini

Dr. Diego Flichman

Lic. María Mercedes Elizalde

---

## **Mutaciones K130M V131I en la proteína X del virus de la hepatitis B y sus implicancias en los mecanismos de patogenia de la infección crónica**

### **RESUMEN**

La proteína X del virus de la hepatitis B (HBV-X) está asociada a la patogénesis de la enfermedad hepática en la infección crónica por HBV. Es una proteína regulatoria multifuncional, capaz de regular numerosos procesos virales y celulares, entre ellos la apoptosis y la autofagia. Entre las mutaciones que ocurren naturalmente durante el curso de la infección crónica B, se encuentran las del promotor basal del core (BCP). Debido a la superposición de los marcos de lectura del genoma de HBV, las mutaciones en el BCP también afectan a HBV-X. Los cambios más frecuentemente reportados son la doble mutación A1762T/G1764A, que se traduce a K130M y V131I en HBV-X. Se desconoce el efecto que producirían estas mutaciones sobre la actividad biológica de HBV-X. El objetivo de esta Tesis fue establecer las implicancias de las mutaciones en los aminoácidos 130-131 de HBV-X sobre la actividad biológica de la proteína. Particularmente, se caracterizó el efecto de la presencia de distintos aminoácidos en la inducción de los mecanismos de apoptosis y de autofagia y se analizaron las vías de transducción de señales de la apoptosis celular que podrían ser afectadas por las distintas variantes de HBV-X.

Se clonó el gen X salvaje y mutado de los subgenotipos de mayor prevalencia en la región (F1b y F4), y se expresaron de manera transiente las distintas variantes de HBV-X en las líneas celulares HepG2, Hep3B y Huh7. Como consecuencia de la expresión de HBV-X salvaje y mutada de los subgenotipos F1b y F4 aumentó la mortalidad celular. Además, se demostró que la muerte de las células con expresión de HBV-X se producía mediante el mecanismo de apoptosis. El estudio de las vías de señalización involucradas en la muerte por apoptosis mostró que HBV-X salvaje y mutada de los dos subgenotipos modulan diferencialmente la expresión de proteínas pro-apoptóticas (Bax) y anti-apoptóticas (Bcl-X y Bcl-2) pertenecientes a la familia de Bcl-2, y demuestra la participación de la vía apoptótica mitocondrial. Por último, el análisis del proceso autofágico demostró que las variantes de HBV-X inducen la autofagia en este sistema.

En conjunto, estos resultados revelan que las HBV-X con distintas duplas aminoacídicas en 130-131 de los subgenotipos F1b y F4 activan los mecanismos de apoptosis y de autofagia en las tres líneas de hepatoma estudiadas. Asimismo, demuestran que la vía apoptótica mitocondrial está involucrada en la muerte inducida por las dos variantes de la HBV-X. La prolongada inducción de los procesos de apoptosis y de autofagia en los hepatocitos que expresan ambas variantes de HBV-X jugaría un importante rol en la patogenia de la infección por HBV, contribuyendo al desarrollo de enfermedad hepática severa y de HCC en los pacientes infectados crónicos.

Los resultados presentados en esta Tesis describen algunos de los mecanismos moleculares mediante los cuales distintas variantes de HBV-X contribuyen a la patogenia en el hígado infectado. Además, aportan en la caracterización biológica y molecular del genotipo F, autóctono latinoamericano, responsable de la mayoría de las hepatitis crónicas B en nuestra región.

## AGRADECIMIENTOS

A mi directora, la Dra. Luciana Barbini, por confiar en mí para la realización de este trabajo e iniciarme en el campo de la Virología, por estar siempre presente y dispuesta para guiarme en el desarrollo de mi trabajo experimental, por su compromiso en este proyecto, por transmitirme su sabiduría y por sus consejos.

Al Dr. Diego Flichman por ayudarme con las correcciones de la tesis.

Al Dr. Rodolfo Campos, por dejarme ser parte de su laboratorio, aconsejarme y brindarme todo su apoyo.

A toda la cátedra de Virología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA y muy especialmente a Caro por regalarme su tiempo y sus conocimientos desinteresadamente y por contestar todas mis preguntas con lujo de detalles.

A mis compañeritas de laboratorio Julia y Celes (aunque ya no estás con nosotras), por estar siempre presentes, dispuestas a ayudar, a prestar un oído, dar un consejo y por aguantarme (¡especialmente el último año!).

A todo el laboratorio de Virología del INE de Mar del Plata: Osvaldo, Andrea, Alejandra, Florencia, Valeria y Alicia, por compartir tantos momentos divertidos y por dejarme ser una más de su laboratorio a pesar de ser una “intrusa”.

A mis amigas Mica, Beca, Ceci, Nadia, Amy (a la distancia....) y Romi porque son parte fundamental de mi vida y siempre puedo contar con ellas.

A mi familia, mi papá, mi hermano Juani, “LA TÍA” (no hace falta decir nada más....) y la abuela Conce por el apoyo incondicional, la confianza, los consejos, la tolerancia y porque los quiero.

*A mi vieja con todo mi corazón*

*Sé que desde donde estés vas a estar muy orgullosa de mí*

---

**ÍNDICE**

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
1. Virus de la Hepatitis B.....	7
1.1. Historia.....	7
1.2. Clasificación.....	9
1.3. Estructura del virión.....	10
1.4. Estructura y organización del genoma.....	11
1.5. Ciclo de replicación.....	13
1.6. Proteínas virales.....	15
1.6.a. PreCore y Core .....	15
1.6.b. Proteínas de superficie.....	16
1.6.c. Polimerasa .....	17
1.7. Proteína X.....	18
1.7.a. Características generales.....	18
1.7.b. Funciones de HBV-X .....	20
1.7.b.a. HBV-X es requerida para la replicación viral.....	21
1.7.b.b. Mecanismo de transactivación de HBV-X.....	22
1.7.b.c. Funciones adicionales de HBV-X.....	24
1.7.c. HBV-X y el desarrollo de hepatocarcinoma.....	27
1.8. Patogenia del HBV.....	28
1.9. Historia natural de la infección.....	29
1.9.a. Infección aguda.....	29
1.9.b. Infección crónica .....	30
1.10. Epidemiología molecular del HBV.....	31
1.11. Variabilidad genómica del HBV.....	32
1.11.a. Variantes del promotor basal del core.....	33
2. Apoptosis.....	35
2.1. Características generales.....	35
2.2. Vías de señalización.....	37
2.2.a. Vía extrínseca o de receptores de muerte .....	37
2.2.b. Vía intrínseca o mitocondrial.....	38
2.3. Apoptosis y HBV-X.....	40

---

2.3.a. HBV-X estimula la apoptosis.....	41
2.3.b. HBV-X inhibe la apoptosis.....	42
3. Autofagia.....	44
3.1. Características generales.....	44
3.2. Regulación del proceso autofágico.....	46
3.3. Los virus y el proceso autofágico.....	47
3.3.a. Autofagia y HBV.....	49
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
1. Muestras.....	55
2. Extracción de ADN.....	55
3. Amplificación del gen X mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	55
4. Purificación y determinación de la concentración de los productos de PCR.....	56
5. Clonado del gen X en el vector pGEM-T easy.....	57
5.1. Ligación.....	57
5.2. Transformación de bacterias competentes.....	57
5.3. Digestión con enzimas de restricción.....	57
5.4. Purificación y determinación de la concentración de los insertos.....	58
6. Clonado del gen X en el vector de expresión pcDNA3.0.....	58
6.1. Linealización del vector y tratamiento con fosfatasa alcalina.....	58
6.2. Ligación.....	59
6.3. Transformación, digestión y secuenciación de los insertos.....	59
7. Cultivo de células.....	60
7.1. Líneas celulares.....	60
7.2. Mantenimiento de los cultivos celulares.....	60
8. Transfección transiente.....	61
9. Detección del ARNm del gen X por RT-PCR.....	61
9.1. Extracción de ARN total y digestión con DNAsa.....	61
9.2. Transcripción reversa (RT).....	62
9.3. Reacción en cadena de la polimerasa.....	62
10. Tinción con Azul Tripán (colorante vital).....	63
11. Análisis de la morfología celular por microscopía de contraste de fases.....	64
12. Fragmentación del ADN.....	64
13. Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio.....	65



---

14. <i>Western Blot</i> .....	65
14.1. Obtención de proteínas totales.....	65
14.2. Cuantificación de proteínas totales.....	66
14.3. Electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	66
14.4. Transferencia.....	66
14.5. Inmunodetección.....	67
14.6. <i>Stripping</i> de la membrana.....	67
15. Microscopía electrónica de transmisión.....	68
16. Análisis estadístico.....	68
<b>RESULTADOS</b> .....	69
1. Clonado del gen X.....	70
2. Expresión de HBV-X en células de hepatoma humano.....	70
2.1. Optimización de la transfección.....	71
2.2. Detección del ARNm del gen X mediante RT-PCR.....	71
2.2.a. Subgenotipo F1b.....	71
2.2.b. Subgenotipo F4.....	72
3. Análisis de la viabilidad celular.....	73
3.1. Subgenotipo F1b.....	73
3.2. Subgenotipo F4.....	75
3.3. Comparación del porcentaje de mortalidad en los subgenotipos F1b y F4.....	77
4. Inducción de la apoptosis.....	79
4.1. Subgenotipo F1b.....	79
4.1.a. Alteraciones morfológicas por microscopía de contraste de fases.....	79
4.1.b. Fragmentación del ADN.....	83
4.1.c. Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio.....	84
4.2. Subgenotipo F4.....	91
4.2.a. Alteraciones morfológicas por microscopía de contraste de fases.....	91
4.2.b. Fragmentación del ADN.....	96
4.2.c. Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio.....	97
4.3. Comparación del porcentaje de células apoptóticas en los subgenotipos F1b y F4.....	104
5. Expresión de la familia de proteínas de Bcl-2.....	106
5.1. Subgenotipo F1b.....	106
5.2. Subgenotipo F4.....	110

---

5.3. Comparación de la expresión de las proteínas de la familia de Bcl-2 en los subgenotipos F1b y F4.....	114
6. Inducción de la autofagia.....	117
6.1. Subgenotipo F1b.....	117
6.1.a. Detección de vacuolas autofágicas por microscopía electrónica.....	117
6.2. Subgenotipo F4.....	121
6.2.a. Detección de vacuolas autofágicas por microscopía electrónica.....	121
6.2.b. Detección de LC3.....	125
<b>DISCUSIÓN</b> .....	127
1. Clonado del gen X y expresión en células de hepatoma humano.....	129
2. Análisis de la viabilidad celular.....	130
3. HBV-X_K/V y HBV-X_M/I inducen la apoptosis.....	132
4. HBV-X_K/V y HBV-X_M/I regulan la expresión de la familia de proteínas de Bcl-2....	136
5. HBV-X_K/V y HBV-X_M/I inducen la autofagia.....	139
<b>CONCLUSIONES</b> .....	146
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	148

# ABREVIATURAS

**ABREVIATURAS**

$\lambda$	longitud de onda
$\mu\text{g}$	microgramo
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
aa	aminoácido
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ADNccc	ADN circular covalentemente cerrado
AgAu	antígeno australiano
ALT	alanina aminotransferasa
anti-HBe	anticuerpos contra el antígeno e
anti-HBs	anticuerpos contra el antígeno de superficie
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNpg	ARN pregenómico
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	adenosina trifosfato
BCP	promotor basal del core
BGH	hormona de crecimiento bovina
BH	dominio de homología a Bcl-2
BSA	seroalbúmina bovina
BtHV	virus de la hepatitis del murciélago
$\text{Cl}_2\text{Mg}$	cloruro de magnesio
$\text{cm}^2$	centímetros cuadrados
$\text{CO}_2$	dióxido de carbono
DHBV	virus de la hepatitis del pato
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMEM	medio Eagle modificado por Dulbecco
DNAasa	desoxirribonucleasa
DNMT	ADN metiltransferasa
dNTPs	deoxinucleótidos trifosfatos
DS	desvío estándar

---

DTT	ditiotreitól
ECL	<i>enhanced chemoluminiscence</i>
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
GSHV	virus de la hepatitis de la ardilla
GTP	guanosina trifosfato
HAV	virus de la hepatitis A
HBcAg	antígeno del core del virus de la hepatitis B
HBeAg	antígeno e del virus de la hepatitis B
HBsAg	antígeno de superficie del virus de la hepatitis B
HBV	virus de la hepatitis B
HBV-X	proteína X del virus de la hepatitis B
HCC	hepatocarcinoma
HCl	ácido clorhídrico
HCV	virus de la hepatitis C
HDV	virus de la hepatitis D
HEV	virus de la hepatitis E
HHBV	virus de la hepatitis de la garza
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana
HRP	peroxidasa de rábano picante
JCRB	<i>Japanese collection of research bioresources cell bank</i>
Kb	kilobases
KCl	cloruro de potasio
KDa	kilo Dalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato de potasio monobásico
L	proteína de superficie grande
LB	medio Luria-Bertani
LT	linfocito T
LTc	linfocito T citotóxico
LTh	linfocito T colaborador
M	proteína de superficie mediana
MAP-LC3	<i>microtubule associated protein-light chain 3</i>
MAPK	proteína quinasas activadas por mitógenos
MEM	medio mínimo esencial de Eagle
MgSO <sub>4</sub>	sulfato de magnesio

---

mg	miligramo
mL	mililitro
mM	milimolar
MMLV-RT	transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney
MPTP	poro de transición de la permeabilidad mitocondrial
mTOR	<i>target</i> de rapamicina de mamífero
n	número de réplicas
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	fosfato disódico
NaCl	cloruro de sodio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato monosódico
NER	vía de reparación por escisión de nucleótidos
NF-AT	factor nuclear de las células T activadas
ng	nanogramo
nm	nanómetro
nt	nucleótido
ORF	marco abierto de lectura
pb	pares de bases
PBS	<i>buffer</i> fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PE	fosfatidiletanolamina
PHBV	virus de la hepatitis del loro
PI3K	fosfatidil inositol 3 quinasa
PI3P	fosfatidil inositol 3 fosfato
pmol	picomol
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PT	proteína terminal de la polimerasa del HBV
PVDF	fluoruro de polivinilideno
RER	retículo endoplásmico rugoso
RGHV	virus de la hepatitis del ganso
ROS	especies reactivas del oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
RNAse	ribonucleasa
RT	transcripción reversa
rt	dominio transcriptasa reversa de la polimerasa del HBV

---

S	proteína de superficie pequeña
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SOC	medio de cultivo súper óptimo con represor catabólico
STHBV	virus de la hepatitis de la cigüeña
TAE	tris-acetato-EDTA
TBS	<i>buffer</i> Tris salino
TE	<i>buffer</i> Tris-EDTA
TGF- $\beta$ 1	factor de crecimiento transformante beta 1
Tm	temperatura de <i>melting</i>
TNF	factor de necrosis tumoral
TSAP	fosfatasa alcalina termosensible
T-TBS	tween20 - <i>Buffer</i> Tris salino
U	unidades enzimáticas
UI	unidades internacionales
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UV	luz ultravioleta
V	voltios
VDAC3	canal aniónico dependiente de voltaje 3
WHV	virus de la hepatitis de la marmota
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil $\beta$ -D-galactopiranósido

# INTRODUCCIÓN





## INTRODUCCIÓN

### 1. VIRUS DE LA HEPATITIS B

#### 1.1. Historia

El término hepatitis denota la inflamación del hígado. El signo más notable de esta enfermedad es la ictericia, una coloración naranja-amarilla de la piel y conjuntivas, debido a un aumento de la bilirrubina plasmática como resultado de la excreción defectuosa de la bilis por los hepatocitos dañados. Otros síntomas incluyen fiebre, escalofríos, fatiga, náuseas, pérdida de apetito y dolor abdominal. Su causa puede ser infecciosa (viral, bacteriana, micótica o parasitaria), inmunológica (autoanticuerpos) o tóxica (inducida por alcohol, toxinas o fármacos) (Fields et al., 2002).

Se denominan hepatitis virales a aquellas infecciones del hígado causadas por al menos uno de los cinco virus primariamente hepatotrópicos que se conocen en la actualidad: virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la hepatitis D (HDV) y el virus de la hepatitis E (HEV) (Fields et al., 2002).

Las primeras descripciones de la hepatitis viral, son atribuidas a Hipócrates (460-377 a.C.) quien se refirió a la enfermedad como ictericia catarral o epidémica. En 1885 una observación clínica fue documentada por Lurman en Alemania, quien reportó un brote de ictericia en trabajadores de un astillero después de haber recibido la vacuna contra la viruela, preparada a partir de linfa humana (Lurman, 1885). Sin embargo, no fue hasta finales de la década de 1930 que se estableció la existencia de hepatitis transmitida por inoculación de suero humano, al reportarse un importante brote en individuos de Inglaterra quienes habían recibido inóculos de un mismo lote de suero de pacientes convalecientes de sarampión. A estos brotes se les asignó el nombre de ictericia por suero homólogo (MacCallum, 1947). Subsiguientemente, Fox implicó al suero humano como vehículo en la transmisión inter-humana, y además observó que el período de incubación de las hepatitis transmitidas parenteralmente era mucho mayor que el descrito para las hepatitis “infecciosas” conocidas hasta el momento (Fox et al., 1942). Para el comienzo de la Segunda Guerra Mundial se había aceptado la naturaleza viral de la entidad, con al menos dos agentes bien definidos asociados a diferentes características epidemiológicas, uno de transmisión entérica, y otro hemática. En 1947, Mac Callum y Bauer introdujeron los términos de “hepatitis A”, para designar las hepatitis infecciosas o

epidémicas, y “hepatitis B” para las hepatitis séricas (Fields et al., 2002).

La cadena de eventos que culminó con el descubrimiento del HBV, se inició en 1963 cuando Baruch Blumberg comenzó a examinar muestras de sangre en busca de rasgos polimórficos hereditarios en diferentes áreas geográficas del mundo (Blumberg y Krugman, 1981). Para detectar nuevos antígenos, utilizó sueros de pacientes hemofílicos con múltiples transfusiones, debido a que se creía que estos sueros podrían contener anticuerpos contra estas proteínas únicas. Durante el curso de la investigación, Blumberg descubrió que una muestra de suero de un aborigen australiano contenía un antígeno que reaccionaba específicamente con un anticuerpo en el suero de un paciente hemofílico americano, al cual denominó antígeno australiano (AgAu) (Blumberg et al., 1965). Posteriormente, Blumberg probó distintos sueros contra el AgAu, observando que era poco frecuente en las poblaciones sanas de América del Norte y el oeste europeo, pero altamente prevalente en algunas poblaciones de África y Asia, y entre pacientes con leucemia, lepra y síndrome de Down. En 1966 Blumberg, London y Sutnick descubrieron que un niño de 12 años con síndrome de Down en el cual no se había detectado el AgAu anteriormente, unos meses después presentaba el antígeno en sangre, en coincidencia con un cuadro de hepatitis. Estas observaciones sugirieron que, en lugar de estar asociado con polimorfismos hereditarios de proteínas de la sangre, el AgAu estaba vinculado a la hepatitis (Blumberg et al., 1967). Inmediatamente numerosos investigadores comenzaron a explorar esta hipótesis. En pruebas con pacientes con y sin hepatitis, encontraron que aquellos con hepatitis eran AgAu positivos con más frecuencia que aquellos sin la enfermedad. Finalmente, en 1968 estudios realizados por Prince (1968) y Okochi y Murakami (1968), establecieron que el AgAu se encontraba específicamente en el suero de pacientes con hepatitis B, el cual posteriormente pasó a denominarse antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg). El descubrimiento y caracterización del HBsAg fue un avance importante en la investigación de la hepatitis permitiendo el estudio intensivo de la enfermedad y de la naturaleza del agente infeccioso, a pesar de que el propio virus todavía no había sido identificado de forma concluyente (Blumberg, 1977). Permitió el desarrollo de métodos serológicos para la detección de pacientes infectados, que rápidamente pasó a utilizarse en los bancos de sangre, y el desarrollo de la primera vacuna contra la hepatitis B, comercializada en 1982, considerada como la primera vacuna contra el cáncer debido a la significativa asociación de este virus y el desarrollo de hepatocarcinoma.

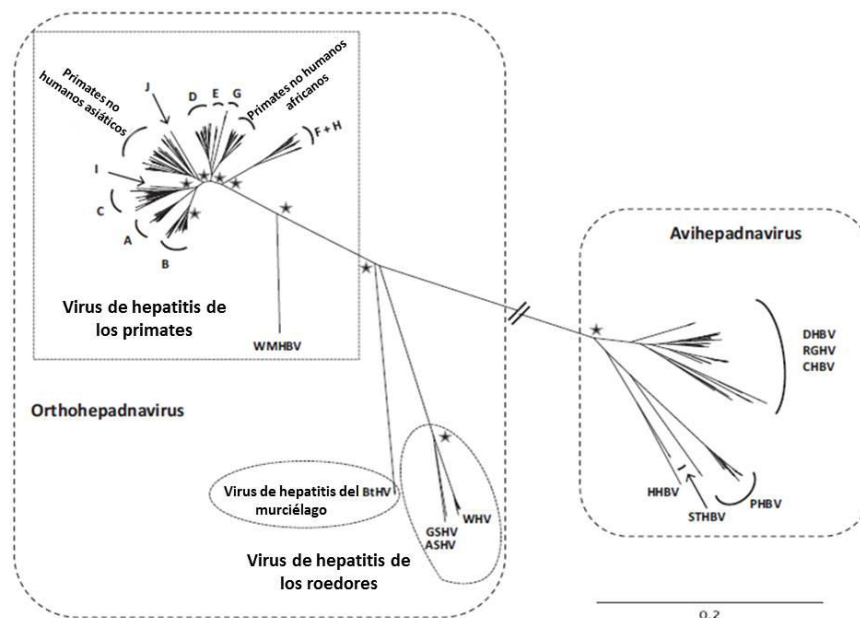
Posteriormente, en 1970 Dane y colaboradores describieron el virión de la hepatitis

B como una partícula de 42 nm de diámetro con envoltura externa donde se encuentra el HBsAg, y una nucleocápside formada por el antígeno del core (HBcAg), junto con una molécula de ADN y una polimerasa viral. Otro antígeno designado e (HBeAg) fue descrito posteriormente por Magnius y Espmark (1972).

## 1.2. Clasificación

El virus de la hepatitis B es el miembro prototipo de la familia *Hepadnaviridae* (virus de ADN hepatotrópicos). Estos virus infectan células hepáticas preferentemente, pero pueden encontrarse pequeñas cantidades de virus en riñón, páncreas y células mononucleares. Los miembros de esta familia comparten ciertas características, tales como el tamaño del virión y su ultraestructura; polipéptidos y composición antigénica distintivas; tamaño del genoma, estructura y organización genética comparables y un mecanismo único de replicación del ADN viral (Fields et al., 2002).

La familia *Hepadnaviridae* se divide en dos géneros (Figura 1). Los *Avihepadnavirus* que afectan a las aves, e incluyen los virus de hepatitis del pato (DHBV), el ganso (RGHV), la garza (HHBV), la cigüeña (STHBV), y el recientemente descubierto virus de hepatitis del loro (PHBV). Y los *Orthohepadnavirus* que infectan a los mamíferos, e incluyen los virus de hepatitis de los roedores, como el virus de hepatitis de la marmota (WHV) y de la ardilla (GSHV), el virus de hepatitis del murciélago (BtHV) y los virus de hepatitis de los primates, dentro de los cuales se encuentra el HBV (Locarnini et al., 2013).



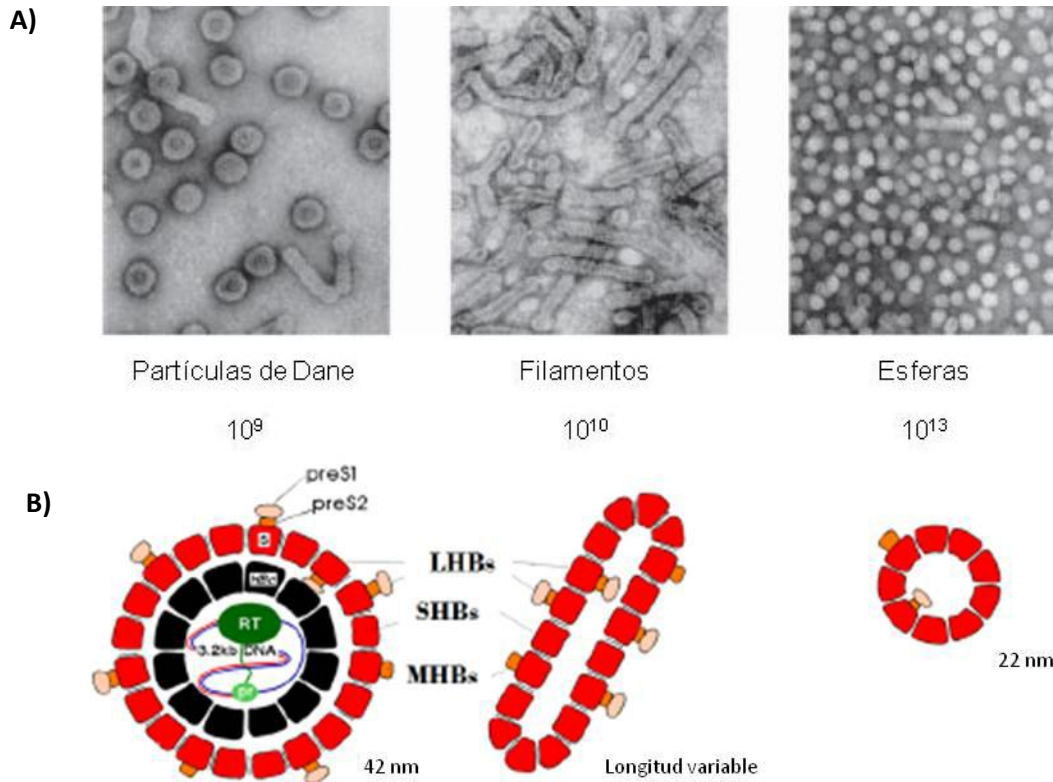
**Figura 1.** Árbol filogenético de los miembros de la familia *Hepadnaviridae*.

### 1.3. Estructura del virión

En el microscopio electrónico se pueden visualizar 3 tipos de partículas virales en el suero de los pacientes infectados: 1) partículas de 42 nm de diámetro de doble membrana, denominadas partículas de Dane, que constituyen el virión intacto; 2) filamentos de 22 nm de diámetro y longitud variable (hasta 250-300 nm) y 3) esferas de 22 nm, habitualmente presentes de  $10^4$ - $10^6$  veces en exceso en relación al número de viriones (Figura 2).

Las partículas esféricas y filamentosas se componen exclusivamente de HBsAg y lípidos del hospedador (fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y triglicéridos) (Gavilanes et al., 1982). Estas partículas carecen de ácido nucleico y, por lo tanto, no son infectivas. Sin embargo, son altamente inmunogénicas e inducen una respuesta eficaz de anticuerpos neutralizantes anti-HBs.

El virión, o partícula de Dane, es esférico con un diámetro de aproximadamente 42 nm. Está formado por una cápside icosaédrica constituida por 120 dímeros de la proteína del Core. La cápside está rodeada por una membrana lipoproteica compuesta por las tres formas de la proteína de superficie, pequeña (S, HBsAg), mediana (M, PreS2-S) y grande (L, PreS1-PreS2-S), junto con lípidos del huésped. Las proteínas de superficie L, M y S están presentes en la envoltura del virus en una relación de aproximadamente 1:1:4. A su vez, la cápside rodea una única copia del genoma del virus, al que se encuentra unido covalentemente la polimerasa viral.



**Figura 2.** Estructura de HBV y de las partículas subvirales. **A)** Imágenes de microscopía electrónica de las partículas virales en el suero de un paciente con infección crónica por HBV. **B)** Modelos esquemáticos del virión (partícula de Dane) y de las partículas subvirales.

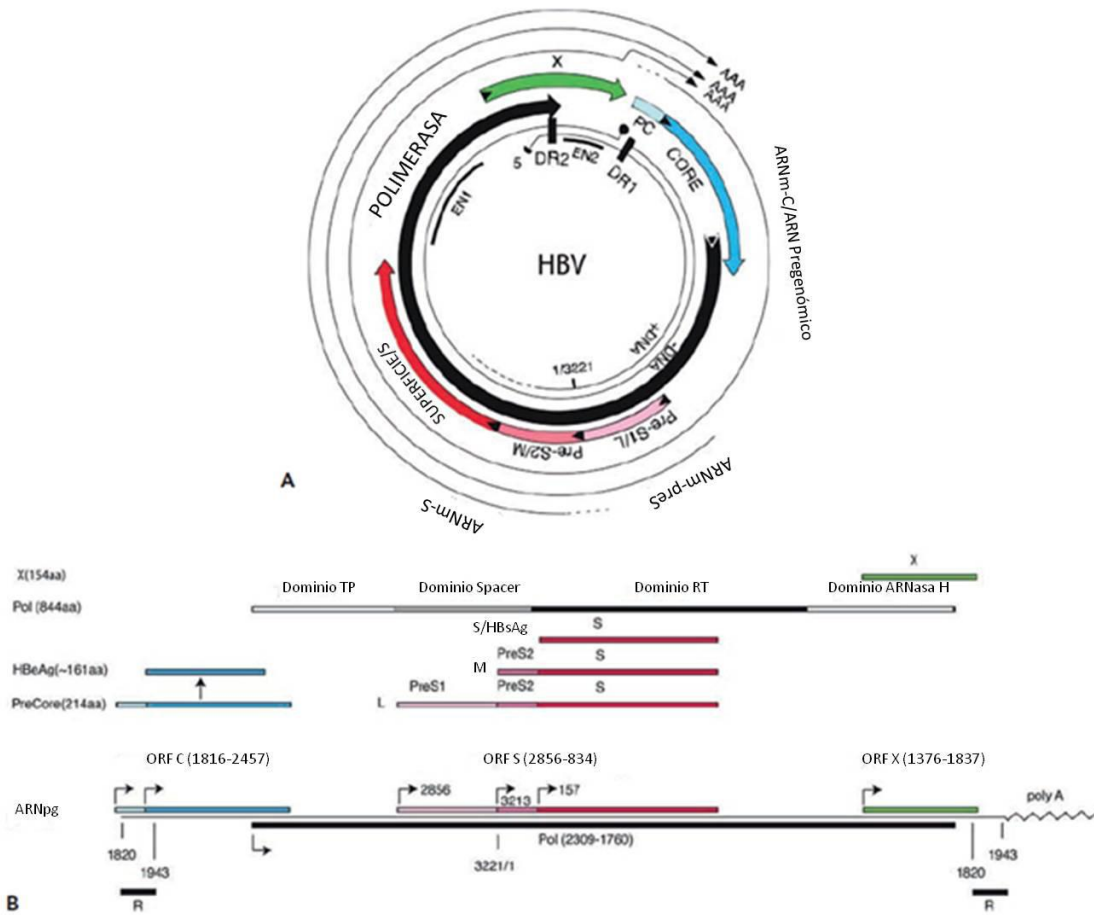
#### 1.4. Estructura y organización del genoma

El HBV posee un genoma de ADN circular laxo parcialmente doble cadena de aproximadamente 3200 pb. La conformación circular del genoma es mantenida por los extremos 5' cohesivos de ambas cadenas de ADN. La cadena negativa (-), complementaria al ARN mensajero viral, posee una unidad de longitud y en su extremo 5' se encuentra unida covalentemente la polimerasa viral. La cadena positiva (+) es incompleta, de aproximadamente dos-terceras partes de la longitud del genoma, y en su extremo 5' posee un oligorribonucleótido de 18 bases de longitud derivado de la región 5' del ARN pregenómico (ARNpg), el cual sirve de molde para la síntesis de la cadena (-) de ADN (Fields et al., 2013).

El genoma del HBV es uno de los más pequeños entre los virus animales, cada nucleótido se encuentra en una región codificante y más del 50 % del mismo presenta

doble codificación. El genoma presenta cuatro marcos abiertos de lectura (ORFs: *Open Reading Frames*) parcialmente superpuestos: el ORF C que codifica las proteínas preCore y Core, el ORF S que codifica las proteínas de superficie L, M y S, el ORF X que codifica la proteína X y el ORF P, que codifica la polimerasa viral (Fields et al., 2013).

Los principales transcritos detectados en el hígado de los pacientes infectados incluyen los ARN mensajeros (ARNm) pregenómico, preC/C, preS y S con una longitud de 3,5 Kb; 3,5 Kb; 2,4 Kb y 2,1Kb, respectivamente. Además, un transcripto menor, el ARNm X, de alrededor de 0,7 Kb, puede ser detectado en los tejidos infectados. Los ARNm pregenómico y preC/C poseen distintos extremos 5', cercanos al codón de iniciación del gen preC. El ARN de mayor longitud se inicia "río arriba" (*upstream*) al codón de iniciación del preC, y se denomina ARNm del preC, y el de menor longitud, que se inicia "río abajo" (*downstream*), es el ARN pregenómico. El ARNpg es el molde para la traducción de las proteínas del Core y de la polimerasa viral y, también para la síntesis del ADN viral mediante transcripción reversa. El ARNm del preC da lugar a la traducción del antígeno e. Los ARNm S también poseen distintos extremos 5' cercanos al codón de iniciación de preS2, y permiten la traducción de las proteínas de superficie M o S. El cuarto transcripto, preS, posee un único extremo 5', y da lugar a la traducción de la proteína de superficie L. Por último, el extremo 5' del ARNm X es también heterogéneo, y permite la traducción de la proteína X. Todos los transcritos virales son codificados por la cadena (-), a los cuales se les adiciona una caperuza (cap) en el extremo 5' y una cola de poli-A en el extremo 3'. Los procesos transcripcionales del genoma están regulados por dos potenciadores (*enhancer I*: EN1 y *enhancer II*: EN2), cuatro promotores (el promotor basal del core, el de preS2/S, el de preS1 y el de X), un elemento silenciador y un elemento CCAAT (caja de inicio de la transcripción) (Seeger y Mason, 2000; Fields et al., 2013) (Figura 3).



**Figura 3.** Estructura y organización del genoma de HBV y las proteínas producidas a partir de los marcos abiertos de lectura.

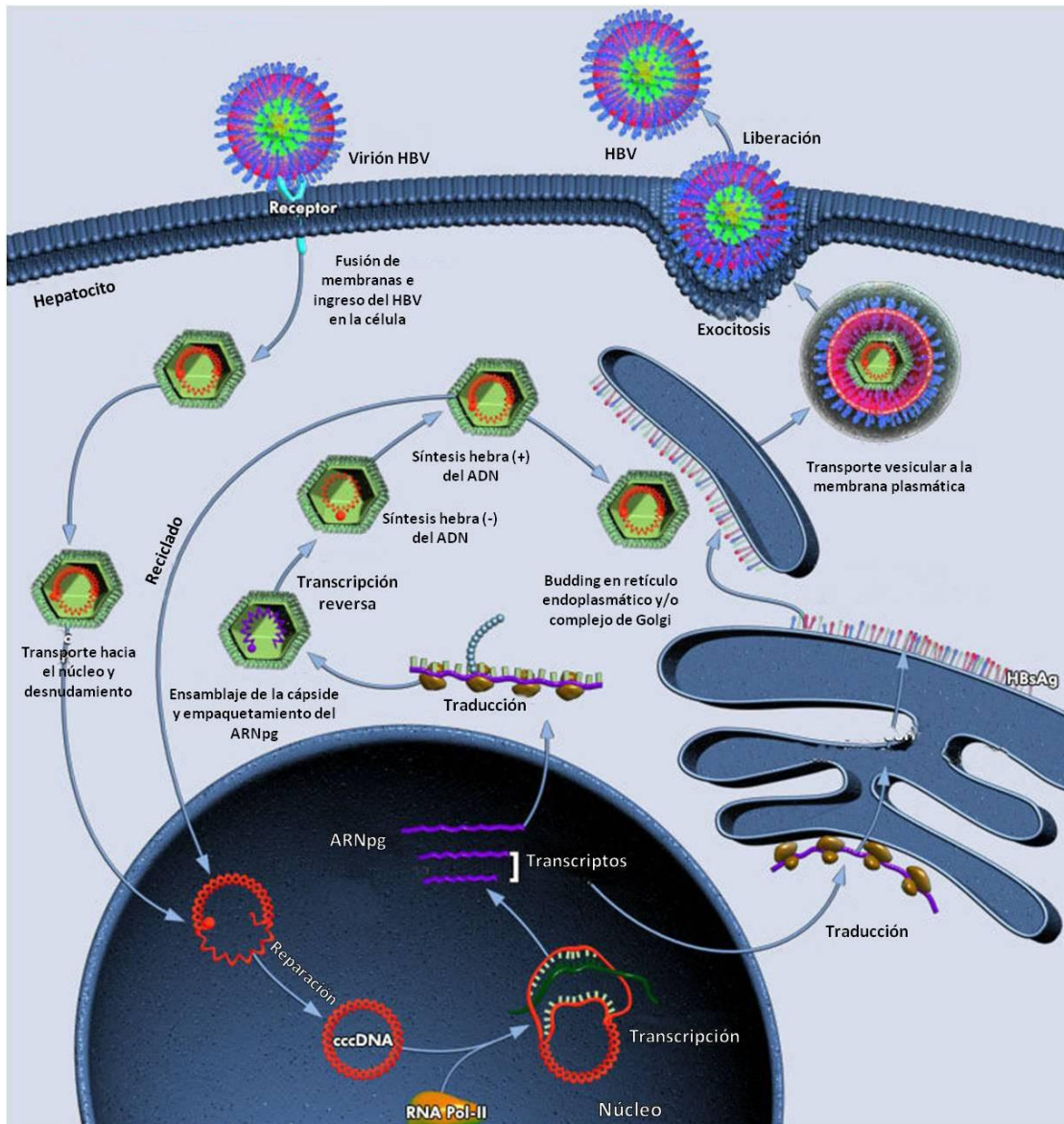
### 1.5. Ciclo de replicación

El HBV se caracteriza por presentar una estrategia particular de replicación del genoma viral, debido a que replica su ADN mediante la transcripción reversa a partir de un intermediario de ARN (ARNpg).

El ciclo de replicación de HBV se inicia con la interacción entre el virión y el/los receptores celulares de la membrana del hepatocito. Hasta el momento, sólo se ha detectado como receptor celular del virus al polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio (NTCP), un transportador transmembrana que se expresa predominantemente en el hígado (Yan et al., 2012). La unión del virus al receptor se cree que depende de un dominio principal de la porción preS1 de la proteína de superficie L, específicamente el epítopo QLDPAF (Glebe y Urban, 2007). Luego de la fusión de la envoltura del virus con

la membrana plasmática, se libera la cápside al citoplasma y ésta se dirige al núcleo conducida por la señal de localización nuclear presente en la proteína del Core. La cápside interacciona con los poros nucleares y se disocia liberando el ADN circular laxo en el interior del núcleo. Dentro del núcleo, se libera la polimerasa del extremo 5' de la cadena (-), la cadena (+) se completa y se unen los extremos de ambas cadenas, formando el ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc), por acción de la polimerasa viral y otras enzimas celulares (Kock et al., 2010). El ADNccc presenta una elevada estabilidad en el tejido hepático crónicamente infectado y persiste en el núcleo de los hepatocitos durante toda la vida de la célula. La cadena negativa del ADNccc sirve de molde para la transcripción de los distintos ARNm virales: ARNpg, preC/C, preS, S y X, mediante la ARN polimerasa II celular. Los transcriptos son exportados al citoplasma celular donde actúan como ARNm para la traducción de las distintas proteínas virales. El ARNpg sirve tanto de molde para la traducción de las proteínas del Core y la polimerasa, así como de precursor para la replicación del ADN viral. En el citoplasma, la polimerasa viral se une al ARNpg en una región denominada  $\epsilon$  (épsilon), ubicada en el extremo 5' del ARNpg. Esto actúa como señal de empaquetamiento del ARNpg en la cápside (Bartenschlager y Schaller 1992). Dentro de la cápside, la actividad de transcriptasa reversa de la polimerasa viral cataliza la síntesis de la cadena (-) del ADN genómico. Luego, la actividad de ARNasa H de la polimerasa, degrada el ARNpg del dúplex ARN-ADN, con excepción de una pequeña porción en el extremo 3' que utiliza como cebador para la síntesis de la cadena (+) incompleta (Lien et al., 1986). Las cápsides maduras pueden volver a liberar el genoma viral en el núcleo de la célula, para amplificar el número de copias del ADNccc, o entrar en la vía secretoria donde adquieren la envoltura junto con sus proteínas de superficie, durante su pasaje por el retículo endoplásmico y/o el aparato de Golgi, y finalmente ser secretadas de la célula en vesículas por exocitosis (Fields et al., 2013) (Figura 4).





**Figura 4.** Ciclo de replicación de HBV.

## 1.6. Proteínas virales

### 1.6.a. PreCore y Core

Las proteínas del preCore y del Core son codificadas por el ORF C y su expresión está regulada por el promotor basal del core. La síntesis de la proteína del preCore se inicia a partir del primer codón de iniciación (ATG), en tanto que, la proteína del Core es sintetizada a partir del segundo. Los 29 aminoácidos (aa) en el extremo N-terminal constituyen un péptido señal que dirigen a la proteína del preCore hacia el retículo

endoplásmico y al camino secretorio. Los primeros 19 aa de la proteína son eliminados por una peptidasa celular y, durante el transporte a la superficie de la célula, se remueven 34 aa del extremo C-terminal. Finalmente, la proteína es secretada como un antígeno soluble de 15 KDa, denominado antígeno e (García et al., 1988). El HBeAg actúa como una proteína inmunomoduladora, en base a dos observaciones clave. Primero, el HBeAg ejercería un rol importante en la persistencia de la infección viral durante la transmisión perinatal, ya que se ha observado que los niños nacidos de madres portadoras de HBV con anticuerpos anti-HBe tienen menor probabilidad de progresar hacia una infección crónica (Terazawa et al., 1991). Segundo, a pesar de que el HBcAg y el HBeAg comparten secuencias de aa, ambos antígenos inducen diferentes vías de linfocitos T (LT) colaboradores o *helper* (LTh): mientras que el HBcAg induce una respuesta LTh1, el HBeAg promueve la de los LTh2. Además, esta última respuesta es dominante sobre la primera, produciendo una depleción de células LTh1 específicas contra el HBcAg *in vivo* (Milich et al., 1998).

La proteína del Core (HBcAg) es el principal componente de la cápside de HBV. Es una fosfoproteína de 183-185 aa (dependiendo del genotipo viral), y 21 KDa, que se autoensambla formando partículas esféricas. Cada una de ellas constituye una subunidad de la cápside viral. El extremo C-terminal de esta proteína es rico en arginina y tiene como función la unión al ADN viral, en tanto que, en el extremo N-terminal se encuentra la secuencia necesaria para el autoensamble (Fields et al., 2013).

#### **1.6.b. Proteínas de superficie**

Las proteínas de superficie son el producto de la traducción del ORF S que se divide en tres dominios específicos: preS1, preS2 y S. Cada uno de ellos presenta un codón de iniciación distinto, pero un mismo codón de terminación, dando lugar a las tres proteínas de superficie: L (preS1-preS2-S), M (preS2-S) y S (o HBsAg). Estas proteínas poseen dos funciones principales: 1) proporcionan los componentes proteicos de la envoltura del virus y 2) forman agregados que son secretados como partículas subvirales. Las proteínas de superficie comparten un dominio hidrofóbico C-terminal que las inserta en la membrana, mientras que el dominio N-terminal es variable.

La proteína L está involucrada en la adsorción viral mediante la unión de la misma al/los receptor/es celulares. El epítopo involucrado en este mecanismo es la secuencia QLDPAF, comprendida entre los residuos 21 a 47 de la región preS1. Además, una característica particular de la proteína L es que existe en dos conformaciones que difieren en la localización del dominio N-terminal (Ostapchuk et al., 1994). En la primera, el

dominio N-terminal está localizado en el citosol donde es requerido para la unión de la cápside y el ensamblaje de los viriones. En la segunda, el extremo N-terminal está presente en el lumen del retículo endoplásmico y, por lo tanto, expuesta en la superficie de las partículas virales donde participa en la adsorción (Prange y Streeck, 1995).

La proteína S o HBsAg es la principal proteína de envoltura de los viriones y de las partículas subvirales y cumple funciones importantes durante el ensamblado y la secreción del virión (Bruss y Ganem, 1991). Posee una región hidrofílica principal (aa 100 a 160), dentro de la cual se encuentra el inmunodeterminante “a” (aa 124 a 147), considerado como el blanco más importante para los anticuerpos neutralizantes (anti-HBs). Los anticuerpos dirigidos contra este epítopo conformacional, conservado en todos los genotipos de HBV, confieren protección contra la infección. Esta región altamente inmunogénica se expone en la superficie de los viriones y de las formas subvirales, y se encuentra sometida a la presión de selección del sistema inmune del hospedador. Por lo tanto, las mutaciones en el inmunodeterminante “a” pueden modificar la antigenicidad de la proteína y conducir al escape inmune a los anticuerpos generados por la vacuna y a fallas en el diagnóstico de la infección (Wu et al., 2010).

#### **1.6.c. Polimerasa**

La polimerasa viral es una enzima multifuncional de 831 aa y 90 KDa codificada por el ORF P. Esta proteína posee un rol fundamental en la replicación viral, llevando a cabo las siguientes funciones: 1) encapsidación del ARNpg; 2) iniciación de la síntesis de ADN; 3) transcripción reversa del ARNpg; y 4) degradación del ARNpg debido a su actividad de ARNasa H asociada.

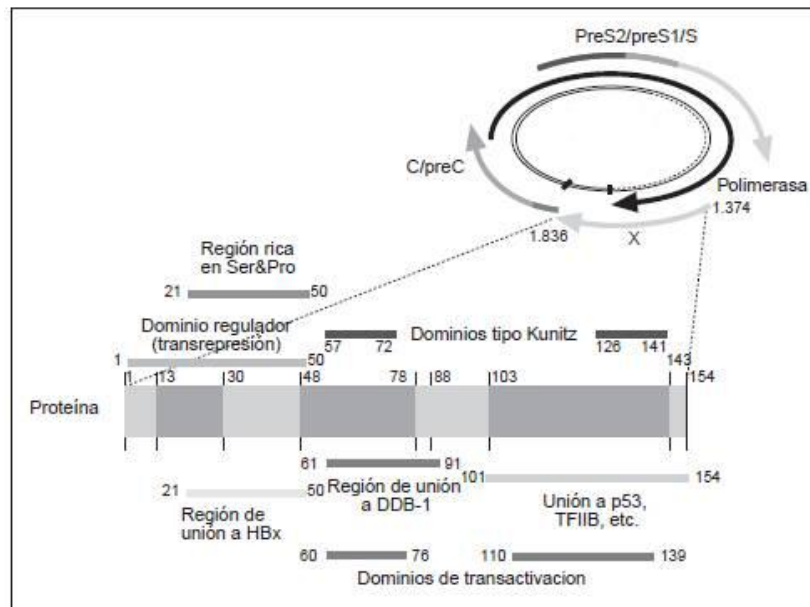
La polimerasa consiste de cuatro dominios conservados: a) el dominio PT, que codifica a la proteína terminal (PT) que interactúa con la región de empaquetamiento del ARNpg; b) el brazo espaciador, cuya función aún se desconoce; c) la transcriptasa reversa/ADN polimerasa-ADN dependiente (rt) y d) el dominio ARNasa H que degrada al ARNpg del híbrido ARN-ADN sintetizado durante la transcripción reversa. La PT se encuentra covalentemente unida al extremo 5' de la cadena (-) del ADN viral, y actúa como cebadora de la síntesis de dicha cadena (Landford et al., 1995). La región con actividad rt es un dominio funcional que lleva a cabo la transcripción reversa del ARNpg y la síntesis de la cadena (+) del ADN viral. La ausencia de una actividad correctora de errores (*proofreading*) de la rt introduce un gran número de mutaciones durante la replicación del genoma viral, generando la elevada variabilidad genética de HBV.

## 1.7. Proteína X

### 1.7.a. Características generales

La proteína X (HBV-X) es codificada por el ORF X y traducida a partir de un ARNm controlado por el promotor de HBV-X. La proteína se compone de 154 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 17,5 KDa. La denominación de gen/proteína X se debe a que la secuencia deducida de aminoácidos no muestra homología con ninguna otra proteína conocida hasta el momento. La HBV-X se encuentra presente en todos los *Orthohepadnavirus*, pero no así en los *Avihepadnavirus* (Bouchard y Schneider, 2004).

Debido a las dificultades en producir cantidades suficientes de proteína soluble, poco se conoce acerca de la estructura tridimensional y características bioquímicas de la misma. Los análisis comparativos de las secuencias del gen X de *Hepadnavirus* de mamíferos de diferentes especies revelaron áreas de elevada conservación, incluyendo dominios helicoidales presuntivos localizados en las regiones N-terminal y C-terminal, y un potencial motivo estructural de hélice superenrollada (*coiled-coil motif*). Se ha demostrado que los aminoácidos 52 a 148 son esenciales para la actividad biológica de la proteína. Además, la delección de los aminoácidos 1 a 50 aumenta las funciones transactivadoras de HBV-X, sugiriendo que podría tratarse de un elemento regulador negativo (Kumar y Sarkar, 2004). Aunque no presenta homología con ningún gen humano conocido, esta proteína viral contiene una secuencia rica en cisteínas similar al dominio tipo Kunitz encontrado en serinproteasas. En un intento por definir la estructura de la HBV-X mediante ensayos de espectroscopía, Rui y colaboradores (2005), utilizaron una forma de HBV-X que presentaba sus cisteínas N-terminales delecionadas, y concluyeron que HBV-X aparece como una proteína no estructurada que puede adquirir una estructura secundaria bajo condiciones específicas. Estos autores propusieron que HBV-X podría plegarse y adquirir una función específica mediante su interacción con sus proteínas *target*, y que esta flexibilidad podría explicar, en parte, las diversas actividades descritas para la HBV-X. Además, se ha reportado que los residuos de cisteína presentes en la región N-terminal de la proteína podrían estar involucrados en la dimerización de HBV-X (Gupta et al., 1995). Sin embargo, el rol que cumple la dimerización de esta proteína en su actividad biológica no ha sido dilucidado hasta el momento (Figura 5).



**Figura 5.** Estructura de HBV-X. La capacidad activadora de la transcripción estaría localizada en el extremo C-terminal de la proteína (aa 110-139), y entre los aminoácidos 60 y 76. Estas dos regiones son también las responsables de la interacción de HBV-X con numerosas proteínas celulares. HBV-X posee la capacidad de interactuar consigo misma, a través de los aminoácidos 21 a 50.

Varios grupos de investigación han reportado que HBV-X puede ser modificada post-traduccionalmente, mediante reacciones de fosforilación y acetilación. La acetilación ocurre en el extremo N-terminal y sólo se ha observado en células de insecto (Urban et al., 1997), mientras que la fosforilación se ha descrito en células de insectos y en células humanas (HepG2). Se ha demostrado que HBV-X puede ser fosforilada *in vitro* por la proteína quinasa C y la quinasa activada por mitógeno (Schek et al., 1991; Lee et al., 2001a). La relevancia de estas modificaciones post-traduccionales en la actividad biológica de HBV-X sigue sin dilucidarse. Asimismo, Noh y colaboradores (2004) propusieron que HBV-X podría ser fosforilada por las quinasas de respuesta extracelular 1 y 2 (ERK1/2), lo que induciría su translocación al núcleo. Además, en un estudio se demostró que la peptidil propil isomerasa Pin1 interactúa específicamente con HBV-X fosforilada aumentando su estabilidad, lo que se correlaciona con un aumento en la actividad transcripcional de HBV-X (Pang et al., 2007).

Diversos estudios han demostrado que HBV-X se encuentra localizada principalmente en el citoplasma celular, pero también puede detectarse en bajos niveles

en el núcleo. Se ha determinado que HBV-X es predominantemente nuclear cuando se expresa en bajos niveles en las células, pero se convierte en citoplasmática a medida que aumentan sus niveles de expresión; en donde una fracción de la proteína citoplasmática co-localiza con las mitocondrias (Henkler et al., 2001). En células de la línea HepG2 y en cultivos de hepatocitos primarios de rata, la fracción mitocondrial de HBV-X está localizada en la membrana mitocondrial externa, lo que se correlaciona con la interacción reportada de HBV-X con canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC). Por otro lado, Cha y colaboradores (2009) reportaron que tanto la HBV-X citoplasmática como la nuclear participan en la replicación del HBV. Además, Keasler y colaboradores (2009), utilizando cultivos celulares y modelos de ratón, confirmaron la importancia de HBV-X nuclear para recuperar la replicación de virus deficientes en HBV-X. La localización de HBV-X durante la replicación viral podría fluctuar dependiendo de la concentración de la misma, pero también de la accesibilidad de sus socios celulares implicados en su importación y exportación nuclear. En este sentido, se ha demostrado que HBV-X tiene la capacidad de unirse a la proteína inhibitoria I $\kappa$ B- $\alpha$ , la cual estaría involucrada en su translocación nuclear (Weil et al., 1999). Otro grupo de investigación también ha demostrado que HBV-X es capaz de interactuar con el transportador nuclear CRM1, y que además la localización citoplasmática de HBV-X es sensible a drogas que inhiben la actividad de CRM1 (Forgues et al., 2001).

La HBV-X, tanto del HBV como del WHV, presenta una vida media que es influenciada por la localización intracelular de la proteína, teniendo la HBV-X asociada con el citoesqueleto y la nuclear una vida media mayor (aproximadamente 3 horas), respecto a la proteína soluble en el citoplasma (15 a 20 minutos) (Dandri et al., 1998). La importancia biológica de una vida media diferencial en la actividad de HBV-X se desconoce hasta el momento. Bergametti y colaboradores (2002) mostraron que la unión de HBV-X a la proteína de unión al ADN dañado DDB1 la protege de su degradación. Esta interacción ocurre preferencialmente en el núcleo y podría explicar el aumento en la vida media de la forma nuclear.

### **1.7.b. Funciones de HBV-X**

La HBV-X es una proteína regulatoria esencial para la replicación viral y que es requerida para el establecimiento de la infección. Es una proteína multifuncional que actúa como activador transcripcional de numerosos promotores virales y celulares. La HBV-X no se une directamente al ADN, sino que actúa mediante interacciones proteína-proteína,

provocando la activación transcripcional a través de su interacción con factores nucleares de transcripción y la modulación de vías de señalización citoplasmáticas (Murakami, 2001). Mediante la interacción con factores de transcripción o componentes de las vías de transducción de señales, la HBV-X puede regular una amplia variedad de genes celulares, modulando así la transcripción génica, la degradación de proteínas, las vías de señalización, la reparación del ADN, la proliferación celular, la progresión del ciclo celular, la senescencia, como así también los procesos de apoptosis y de autofagia. La alteración de distintos procesos celulares regulados y/o modulados por HBV-X puede llevar, en el caso de la persistencia viral que ocurre en las infecciones crónicas, al desarrollo de enfermedades hepáticas, entre ellas el hepatocarcinoma (Bouchard y Schneider, 2004).

#### **1.7.b.a. HBV-X es requerida para la replicación viral**

Los primeros estudios en mostrar que el producto del gen X es esencial para la replicación viral *in vivo* se llevaron a cabo en la marmota, donde se demostró que genomas del WHV, deficientes en la expresión de la proteína X eran incapaces de replicar en este huésped (Chen et al., 1993; Zoulim et al., 1994). Contrariamente, utilizando un modelo similar otros investigadores indicaron que estos virus mutantes son capaces de replicar, aunque a muy bajos niveles y que revertantes del WHV expresando la proteína X salvaje aparecían rápidamente, indicando la importancia de la proteína salvaje para la replicación viral (Zhang et al., 2001). Estas observaciones están apoyadas por un estudio en el cual, mediante la inyección hidrodinámica del genoma del HBV deficiente en HBV-X en ratones, se demostró que la replicación viral se encuentra altamente comprometida. La expresión de HBV-X en este modelo fue capaz de restablecer la replicación viral y la viremia a niveles similares a la infección con el virus salvaje (Keasler et al., 2007). De manera similar, ensayos con ratones transgénicos, que expresaban constitutivamente el genoma salvaje o un genoma mutado que no expresaba HBV-X, mostraron que HBV-X aumenta la replicación viral, incluso si la proteína no es esencial para el ciclo de vida del virus en ese modelo (Xu et al., 2002). Dificultades similares se han reportado al tratar de establecer el rol de HBV-X en la replicación viral en células en cultivo. Se determinó que genomas del HBV deficientes en HBV-X son capaces de replicar en células de la línea Huh-7, en tanto que la replicación viral se encontraba fuertemente inhibida en células de la línea HepG2, utilizando los mismos genomas (Bouchard et al., 2001a; Keasler et al., 2007). Las discrepancias halladas en los resultados de los distintos ensayos indican la necesidad de estudiar la actividad de HBV-X en un contexto de replicación lo más cercano

posible a la situación *in vivo*. Con excepción de los estudios en modelos *in vivo*, el rol de HBV-X durante el ciclo de replicación del virus no ha sido evaluado, lo que ha dificultado la interpretación de los datos obtenidos y el esclarecimiento del verdadero rol de esta proteína. Sin embargo a pesar de estas limitaciones experimentales, la mayoría de los estudios apoyan firmemente la importancia y función de HBV-X en el ciclo de replicación del virus.

#### **1.7.b.b. Mecanismo de transactivación de HBV-X**

La HBV-X es un activador transcripcional de doble especificidad que ejerce sus funciones tanto en el citoplasma, mediante la modulación de vías de transducción de señales, como en el núcleo de los hepatocitos, interfiriendo directamente con los factores de transcripción.

Se ha demostrado que la HBV-X nuclear aumenta la expresión de numerosos genes virales y celulares incluyendo promotores y *enhancers* del HBV, la subunidad RPB5 de la ARN polimerasa II, componentes de la maquinaria de transcripción celular como TFIIB y TFIIH, la proteína de unión a TATA (TBP) y proto-oncogenes como c-jun, c-fos y c-myc (Twu et al., 1993; Cheong et al., 1995; Qadri et al., 1995; Haviv et al., 1998). Además, se ha reportado que HBV-X posee la capacidad de interactuar y de activar factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, la proteína activadora 1 y 2 (AP-1 y AP-2), el factor activado por calcio NF-AT y el factor de activación transcripcional (ATF)/CREB (Chirillo, et al., 1996; Kumar y Sarkar, 2004). La HBV-X también puede activar promotores de genes celulares asociados con la proliferación celular como el de interleuquina 8 (IL-8), del factor de necrosis tumoral (TNF), del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1) y del factor de respuesta al crecimiento temprano (EGRF) (Andrisani y Barnabas, 1999). La señalización mediada por TGF- $\beta$ 1 involucra la fosforilación de la proteína Smad3 en los residuos de serina 208 y 213 de la región *linker* (Smad3L) y en los residuos de serina 423 y 425 de la región C-terminal (Smad3C). La vía mediada por Smad3C inhibe el crecimiento celular *in vivo*, en tanto que la señalización mediada por Smad3L promueve la proliferación celular a través de la activación de la oncoproteína c-myc. Se ha observado que HBV-X posee la capacidad de cambiar la señalización de TGF- $\beta$ 1 de la vía supresora de tumores mediada por Smad3C a la vía oncogénica mediada por Smad3L (Murata et al., 2009).

La HBV-X citoplasmática tiene la capacidad de activar numerosas vías de transducción de señales. Se ha demostrado que HBV-X activa las vías de la proteína



quinasas activadas por mitógenos (MAPK), incluyendo las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), las proteína quinasas activadas por estrés/quinasas c-Jun N-terminal (SAPK/JNKs) y la quinasa p38, y la vía de señalización JAK/STAT (Benn y Schneider, 1994; Benn et al., 1996; Lee y Yun, 1998; Tarn et al., 2002). La activación mediada por HBV-X de estas vías es dependiente de la activación de la familia de tirosina quinasas de Src (Klein y Schneider, 1997). Sin embargo, Bouchard y colaboradores (2001a) demostraron que HBV-X no interactúa directamente con las quinasas Src, sino que induce la activación de quinasas activadoras de la familia de Src [quinasa de adhesión focal (FAK) y la tirosina quinasa rica en prolina (Pyk2)] mediante la modulación de los niveles de calcio citosólico. En células que expresan HBV-X se demostró que la expresión de la proteína se correlaciona con un aumento del calcio citosólico (McClain et al., 2007) y se ha propuesto que HBV-X podría regular los niveles de calcio en el citosol mediante su interacción con la mitocondria. Diferentes estudios mostraron que HBV-X es capaz de asociarse con la mitocondria, modificar su arquitectura e inducir su despolarización (Kim et al., 2007; Clippinger y Bouchard, 2008). La interacción de HBV-X con la mitocondria se produce mediante los componentes del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (MPTP) como el VDAC3, que regula la apertura del MPTP e influencia los niveles de calcio citosólico (McClain et al., 2007). Además, Chami y colaboradores (2003) demostraron que la desregulación de la señalización por calcio mediada por HBV-X se debe tanto a una reducción en la captación por parte de la mitocondria como a la inactivación de la ATPasa de calcio de la membrana plasmática. El rol de los niveles de calcio citoplasmático como un mediador en las actividades de HBV-X, ha sido confirmado para la activación de las vías de señalización de las MAPK, así como para la activación de factores de transcripción como NF-AT (Tarn et al., 2002). Se ha observado que la activación de NF-AT por HBV-X es dual: está involucrada en la defosforilación y translocación nuclear de NF-AT mediante un mecanismo dependiente de calcio/calcineurina, mientras que la HBV-X nuclear interactúa directamente con el dominio de transactivación de NF-AT, aumentando su actividad transcripcional (Canetti et al., 2003).

Asimismo, diversos estudios han demostrado el rol fundamental de la señalización por calcio mediada por HBV-X para la replicación viral. Sin embargo, aunque los agentes movilizados de calcio pueden rescatar la replicación del HBV hasta un 50 % en genomas deficientes en HBV-X, estos compuestos no aumentan la actividad de la polimerasa viral de la misma manera que HBV-X (Bouchard et al., 2003). Los resultados

---

obtenidos indican que además de la regulación de los niveles citosólicos de calcio, HBV-X posee funciones adicionales en la replicación viral (Figura 6).

#### **1.7.b.c. Funciones adicionales de HBV-X**

El gen supresor de tumores p53 es un factor de transcripción cuya función es el mantenimiento de la integridad genómica, ejercida mediante el control de las repuestas celulares a distintos tipos de estrés. El gen p53 puede regular la progresión del ciclo celular, la apoptosis, la reparación del ADN y la senescencia. Mutaciones y polimorfismos del gen p53 han sido asociados con el desarrollo del hepatocarcinoma (HCC); se estima que más del mitad de los carcinomas hepatocelulares presentan la inhibición funcional del gen p53 (Yoon et al., 2008). Numerosos estudios han demostrado que HBV-X puede interactuar *in vivo* e *in vitro* con el gen p53 (Feitelson et al., 1993; Truant et al., 1995). La HBV-X bloquea la región específica de unión de p53 al ADN, inhibiendo sus funciones más críticas (Wang et al., 1994). Por ejemplo, Chung y colaboradores (2003) reportaron la disminución en la actividad de la proteína supresora de tumores PTEN mediada por HBV-X, a través de la represión de la actividad transcripcional de p53. Por otro lado, p53 puede unirse e inactivar *enhancers* de HBV inhibiendo su replicación, sin embargo esta inhibición puede ser disminuía luego de la expresión de HBV-X (Doitsh y Shaul, 1999). Varios autores han propuesto que HBV-X podría interactuar y secuestrar a p53 en el citoplasma conduciendo a su inactivación (Elmore et al., 1997), sin embargo, otros autores no han logrado co-localizar ambas proteínas en el citoplasma (Su et al., 2000). Dado que la inhibición funcional de p53 es una anormalidad muy común en células tumorales humanas podría suceder que HBV-X, mediante la inactivación de p53, participara en el desarrollo del HCC, y en la elevada inestabilidad cromosomal de los tumores asociados a la infección por HBV.

Además, se ha reportado que HBV-X interacciona con componentes del proteasoma como PSMA7, la subunidad  $\alpha$  del complejo 20 S, o con PSMC1, una subunidad del factor regulatorio 19 S (Zhang et al., 2000). Sin embargo, se desconoce si HBV-X inhibe la actividad del proteasoma o si el proteasoma es requerido para la actividad de HBV-X. Hu y colaboradores (1999) reportaron que la inhibición del proteasoma impide la actividad transcripcional de HBV-X, por el contrario otro estudio sugirió que HBV-X podría aumentar la replicación del HBV mediante la inhibición del proteasoma. Estos autores demostraron que inhibidores del proteasoma restablecen la replicación del virus que no expresa HBV-X a niveles similares al virus salvaje, en tanto

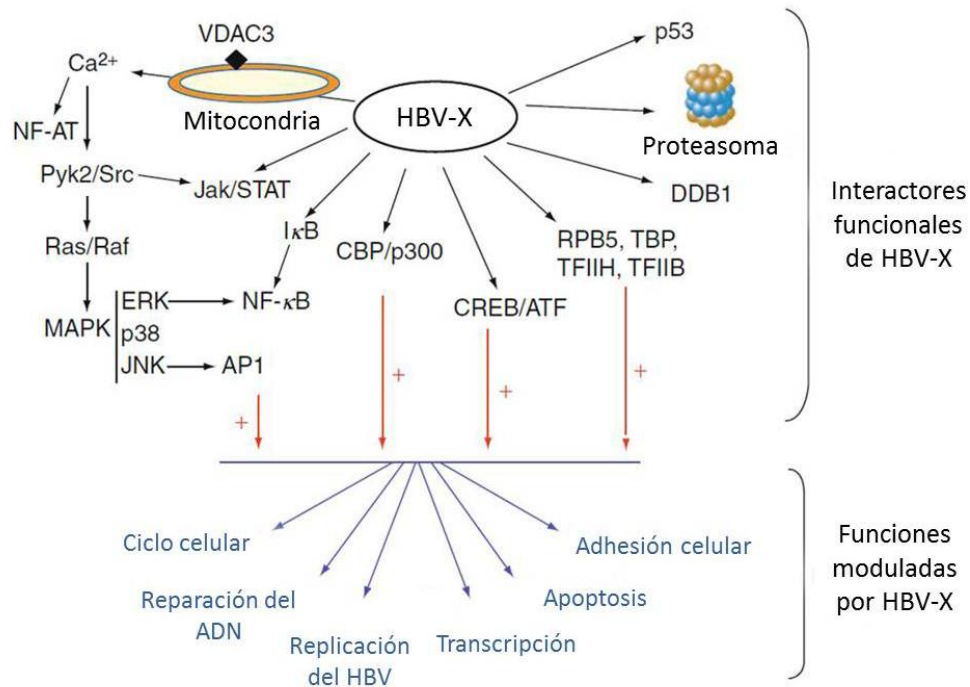
que estos compuestos no tienen efecto en la replicación del virus salvaje (Zhang et al., 2004).

La HBV-X también puede modificar la expresión génica mediante mecanismos epigenéticos, o cambios en la expresión génica mediados por procesos distintos a la alteración de la secuencia nucleotídica. Entre estos mecanismos se encuentra la metilación del ADN, mediada por la familia de proteínas de ADN metiltransferasas (DNMT), que catalizan la adición de un grupo metilo en el quinto átomo de carbono de un residuo de citosina para formar 5-metil citosina. La metilación del ADN impacta sobre el nivel de compactación de la cromatina, afecta la interacción entre el ADN y los factores de transcripción y, consecuentemente, influencia la expresión génica (Chen y Li, 2004). Una consecuencia de la hipermetilación del ADN es la inactivación de genes supresores de tumores. Estudios recientes han demostrado que HBV-X puede aumentar la transcripción de las ADN metiltransferasas DNMT1 y DNMT3 y que mediante la inducción de la transcripción de DNMT1, reprime la expresión de genes como el de la proteína de adhesión celular E-cadherina, la glutatión S-transferasa P1 (GSTP1), la proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina 3 (IGFBP-3) y el gen supresor de tumores p16<sup>INK4A</sup>, a través de la hipermetilación de sus promotores (Lee et al., 2005; Jung et al., 2007; Park et al., 2007).

Los sistemas de reparación del ADN son fundamentales para el mantenimiento de la integridad del genoma celular a través del reconocimiento y la reparación del ADN dañado o alterado. La vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER) es responsable de la reparación de varias alteraciones en el ADN. El factor de transcripción II H, que incluye las subunidades XPB y XPD, está involucrado en el NER. El gen supresor de tumores p53 interacciona con XPB y XPD para inhibir su translocación de los sitios dañados en el ADN, lo que estabilizaría la formación de estos complejos (Wang et al., 1995; Leveillard et al., 1996). Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la unión de HBV-X a p53 impide la unión de este gen las subunidades XPB y XPD, interfiriendo de esta forma, con la reparación del ADN (Qadri et al., 1996; Jaitovich-Groisman et al., 2001). Además, HBV-X también puede interactuar e inactivar a la proteína DDB1 de unión al ADN dañado (Lee et al., 1995).

Finalmente, varios estudios han analizado el impacto de la expresión de HBV-X sobre el ciclo celular. Se ha observado que la activación de las vías de transducción de señales de MAPK, JNK y Src quinasas por parte de HBV-X estimula la progresión del ciclo celular, acelerando la progresión de la fase G0 a la fase G1, así como de la fase G2

a la fase M (Koike et al., 1994b; Benn y Schneider 1995). En efecto, Bouchard y colaboradores (2001b) demostraron que células crecidas serodeprivadas y que expresan HBV-X salen de la fase G<sub>0</sub>, pero se detienen en el límite de la fase G<sub>1</sub>/S. De manera similar, se ha reportado que HBV-X induce la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular p21 y p27, con el subsecuente arresto de las células en la fase G<sub>1</sub>/S (Park et al., 2000; Qiao et al., 2001). Sin embargo, otros trabajos han reportado que la represión de p21 por parte de HBV-X que conduce al crecimiento celular (Ahn et al., 2001). Estos resultados discordantes acerca de la actividad biológica de HBV-X podrían ser consecuencia de los diversos modelos utilizados y/o de los diferentes niveles de expresión de HBV-X que se logran en los distintos sistemas de estudio. Se propone que HBV-X podría regular diferencialmente la progresión del ciclo celular dependiendo del estado de diferenciación de la línea celular. Ensayos realizados con ratones transgénicos que expresan HBV-X también muestran resultados discordantes. Madden y colaboradores (2001) reportaron que la expresión de HBV-X está asociada con un aumento significativo en el número de hepatocitos en fase S en ratones jóvenes, pero no en ratones adultos. Por otro lado, otros autores observaron el mismo patrón descrito en células en cultivo, en el cual HBV-X promueve la transición de hepatocitos quiescentes de la fase G<sub>0</sub> a la fase G<sub>1</sub>, los cuales se detienen en el límite de la fase G<sub>1</sub>/S y luego mueren por apoptosis (Wu et al., 2006) (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema de funciones asociadas a HBV-X.

### 1.7.c. HBV-X y el desarrollo de hepatocarcinoma

La infección crónica por el HBV es el principal factor de riesgo para el desarrollo de HCC. Luego de varias décadas de infección crónica activa, alrededor del 30 al 40 % de los pacientes progresan a una cirrosis hepática, de los cuales, del 1 al 5 % desarrollará HCC. El HCC se ubica quinto entre las formas más comunes de cáncer alrededor del mundo y tercero entre los tipos de cáncer más letales (Liu y Kao, 2007).

Una característica muy común en los pacientes con HCC es la integración de fragmentos del genoma del HBV en el genoma de la célula huésped. Se ha observado que la mayoría de estas secuencias integradas incluyen al gen X, el cual es traducido a una HBV-X, que incluso troncada, mantiene su actividad transactivadora (Murakami, 2001). Por otro lado, los miembros de la subfamilia de *Ortohepadnavirus*, cada uno de los cuales codifica una HBV-X funcional, desarrollan HCC, no obstante las aves infectadas con el otro miembro de la familia *Hepadnaviridae*, los *Avihepadnavirus*, que no codifican una HBV-X funcional, no desarrollan este tipo de tumor (Robinson, 1994).

El rol tumorigénico de HBV-X ha sido estudiado utilizando modelos animales y células en cultivo, sin embargo los resultados son controversiales. Se ha demostrado que HBV-X es capaz de transformar varias líneas celulares como la línea de fibroblastos de

ratón NIH3T3 y la línea celular de roedor Rev-2, que expresa el antígeno T del virus simiano 40 (Seifer et al., 1991; Gottlob et al., 1998a). Contrariamente, otros investigadores han reportado que HBV-X suprime la transformación de fibroblastos primarios de rata o de células NIH3T3 transformadas por diferentes oncogenes, debido a la inducción de la apoptosis (Kim et al., 1998; Schuster et al., 2000). El potencial oncogénico de HBV-X también ha sido estudiado en modelos de ratones transgénicos y ha generado resultados discordantes. Estos estudios han sido realizados en ratones con distinto *background* genético, y la expresión de HBV-X era controlada ya sea por su propia secuencia *enhancer/promotora* o por promotores heterólogos específicos del hígado (Koike, 2002). El desarrollo de HCC asociado a la expresión de HBV-X ha sido descrito para una línea de ratones transgénicos que expresan altos niveles de HBV-X en el hígado (Kim et al., 1991; Koike et al., 1994a). Mientras que en otros linajes transgénicos, la expresión de HBV-X no ha conllevado al desarrollo de HCC (Billet et al., 1995). Es probable que el gen X utilizado para generar estos ratones transgénicos, así como la vida media de HBV-X puedan impactar en el desarrollo del HCC. Sin embargo, aunque se necesite ampliar los estudios para confirmar que HBV-X es capaz de inducir la transformación en ratones, su rol como cofactor en la carcinogénesis se encuentra más aceptado. Se ha observado que HBV-X coopera con c-myc o con químicos carcinogénicos en la hepatocarcinogénesis (Slagle et al., 1996; Terradillos et al., 1997). Además, se ha reportado, que la expresión de HBV-X en ratones transgénicos induce el desarrollo de HCC en ratones deficientes en p21 (Wang et al., 2004). Aunque hasta el momento se desconocen todos los mecanismos moleculares mediante los cuales HBV-X afectaría la transformación celular, existen varias evidencias que permiten sugerir que las múltiples actividades de esta proteína contribuirían a la hepatocarcinogénesis.

### **1.8. Patogenia del HBV**

El HBV es un virus no citopático. El eventual desarrollo y severidad de la infección por HBV depende de una variedad de factores tanto virales como del hospedador. En general, se acepta que el daño hepatocelular está dado por el reconocimiento de antígenos virales expresados en la superficie del hepatocito infectado por parte de linfocitos T citotóxicos (LTc) CD8+ específicos, bajo la influencia de los LTh1 CD4+, con la consiguiente inducción de la apoptosis de las células infectadas (Fields et al., 2002). Sin embargo, estudios pioneros realizados por Chisari y Ferrari (1995), documentaron que la

eliminación viral ocurre fundamentalmente mediante mecanismos no citolíticos, mediados por el interferón gamma y el TNF- $\alpha$  secretados por células CD8+ y células *natural killer*, a los que sucede una fase complementaria mediada por la actividad citotóxica de dichas células. A su vez, bajo la influencia de LTh2 CD4+, los linfocitos B sintetizan los anticuerpos necesarios para la eliminación del HBV circulante. El reclutamiento de células inflamatorias, como macrófagos y neutrófilos, por los LTc produce la formación de focos “necroinflamatorios”, siendo estos infiltrados primariamente los responsables de la muerte de los hepatocitos. En este estadio se evidencian las manifestaciones del cuadro clínico de hepatitis, con elevación de las enzimas hepáticas (aminotransferasas) (Fields et al., 2002).

Durante la infección aguda autolimitada, la patología es moderada y la replicación viral es controlada por la respuesta inmune del hospedador. Esta respuesta inmune se caracteriza por ser vigorosa, policlonal dirigida contra múltiples epitopes de las proteínas virales, y lleva a la resolución de la hepatitis. Por el contrario, la hepatitis crónica resulta del continuo daño hepático, como consecuencia de una eliminación viral poco efectiva. En este caso la respuesta inmune es débil y dirigida contra uno o pocos epitopes. Los pacientes infectados crónicamente con HBV presentan una respuesta de los LT CD4+ y CD8+ específicos para epitopes virales significativamente disminuída (Fields et al., 2002). Por lo tanto, la respuesta de LT es determinante en la evolución de la infección por HBV: si es vigorosa permite la eliminación viral, en tanto que si es poco efectiva resulta en un daño hepatocelular crónico. Por último, en portadores inactivos la tolerancia a antígenos del HBV produce escaso o ningún daño mediado por el sistema inmune en el hígado infectado (Fields et al., 2002).

## **1.9. Historia natural de la infección**

La infección por el HBV puede resultar en hepatitis aguda o crónica, como consecuencia de esta última puede evolucionar a cirrosis hepática y HCC.

### **1.9.a. Infección aguda**

La infección perinatal o en la niñez es comúnmente asintomática, en tanto que el 30-50 % de los adultos infectados desarrollan síntomas. En casos excepcionales (0,1-0,5 %), la infección aguda puede evolucionar hasta una insuficiencia hepática fulminante (Ganem y Prince, 2004). Después de una infección aguda, aproximadamente el 5 % de los adultos inmunocompetentes, el 90 % de los niños infectados al nacer y el 25-30 % de los niños

infectados entre los 1 y 5 años de edad no pueden clarear la infección y evolucionan a la cronicidad.

### **1.9.b. Infección crónica**

La infección crónica por HBV se define por la persistencia del HBsAg en suero por más de 6 meses. De acuerdo con parámetros clínicos (hallazgos histológicos), bioquímicos [niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT)] y virológicos (niveles séricos de ADN viral y presencia o ausencia del HBeAg) se distinguen cuatro fases en la infección crónica por el HBV (Fattovich et al., 2008):

**a) Inmunotolerancia:** se observa en aquellos pacientes que adquieren la infección perinatalmente o en edades muy tempranas, y puede durar varios años. Se caracteriza por la presencia de HBeAg, niveles elevados de ADN viral, valores normales de ALT y ausencia de lesiones histológicas significativas, aunque no se descarta la posibilidad de fibrosis hepática y de desarrollo de HCC en pacientes que han atravesado por esta fase durante décadas.

**b) Inmunoeliminación o hepatitis crónica HBeAg positiva (+):** se caracteriza por la presencia de HBeAg, niveles elevados o fluctuantes de ADN viral, valores elevados de ALT e histología hepática con grados variables de necroinflamación. La duración de esta fase y las elevaciones persistentes o intermitentes de ALT se asocian con un mayor riesgo de cirrosis y sus complicaciones. En esta fase la seroconversión espontánea anual del HBeAg puede llegar al 10 %.

**c) Hepatitis crónica HBeAg negativa (-):** luego de varios años de infección crónica HBeAg (+), puede ocurrir una pérdida del HBeAg y la seroconversión a positividad de los anticuerpos anti-HBe, originando una hepatitis crónica HBeAg (-). Esta fase se caracteriza por ausencia de HBeAg, presencia de anti-HBe, niveles elevados persistentes o intermitentes de ADN viral y de ALT. En la histología hepática se observa actividad necroinflamatoria. Esta fase representa un estadio más tardío en la historia natural de la hepatitis crónica B, en general, la edad del paciente es más avanzada, las concentraciones de ADN viral son inferiores a las detectadas en la hepatitis HBeAg (+) y las lesiones histológicas son más avanzadas.

**d) Portación inactiva:** Luego de la seroconversión HBeAg, algunos pacientes pueden ingresar a la fase de portador inactivo. Esta fase se caracteriza por ausencia del HBeAg, presencia de anti-HBe, niveles bajos de ADN viral y niveles de ALT persistentemente normales. Habitualmente la biopsia hepática muestra ausencia de actividad



necroinflamatoria. Si bien se considera que la enfermedad no progresa en este período, en este grupo se pueden observar distintos grados de fibrosis e incluso cirrosis inactiva, como consecuencia de una severa injuria hepática desarrollada en la etapa de inmunoeeliminación. En algunos casos puede producirse una reactivación espontánea o secundaria a la inmunosupresión.

Las consecuencias de la infección crónica por HBV incluyen la progresión a la cirrosis, la insuficiencia hepática y el HCC. La incidencia anual de cirrosis es del 2-6 % en la hepatitis crónica HBeAg (+) y del 8-10 % en la forma HBeAg (-). La incidencia anual de HCC es del 1 % en los pacientes con hepatitis crónica, y del 3-10 % en pacientes con cirrosis hepática (Hadziyannis y Papatheodoridis, 2006).

### **1.10. Epidemiología molecular del HBV**

Según datos de la Organización Mundial de la Salud, más 2.000 millones de personas en el mundo han estado en contacto con el virus, y aproximadamente 400 millones son portadores crónicos. La infección crónica por HBV es la principal causa de cirrosis y HCC en el mundo y produce más de 600.000 muertes cada año (WHO, 2008).

La distribución de la infección por HBV varía ampliamente alrededor del mundo. En áreas donde la prevalencia es alta (mayor al 8 %), como en países del extremo sudeste asiático, China y África, la infección crónica por HBV es común y usualmente adquirida en forma perinatal o en la niñez. Por el contrario en los países de baja prevalencia (menor al 2 %), entre los que se incluyen Australia, países de Europa Central y América del Norte, sólo una minoría de la población entra en contacto con el virus, como resultado de transmisión sexual y/o parenteral entre adultos jóvenes. En las áreas no endémicas, hasta el 5% de los infectados evolucionan hacia la cronicidad y, entre ellos, el 10% desarrollará HCC (Lavanchy, 2004).

La heterogeneidad del genoma del virus ha llevado a clasificarlo en al menos 8 genotipos (A-H), considerando una diversidad nucleotídica del 8 % (Norder et al., 1994; Stuyver et al., 2000; Arauz-Ruiz et al., 2002). A su vez, los distintos genotipos pueden ser subdivididos en numerosos subgenotipos, con una diversidad intragenotípica del 4 %. La distribución de los distintos genotipos es esencialmente geográfica. Los genotipos más cosmopolitas son el A y el D, predominantes en Europa, África y América del Norte, y en los países del mediterráneo y del medio oriente, respectivamente. Los genotipos B y C se encuentran en el este y sudeste asiático, y el genotipo E en el oeste de África. El genotipo G se ha aislado en diferentes países como Alemania, Francia, Estados Unidos, México y

Japón. Los genotipos F y H son considerados autóctonos de las poblaciones nativas de las Américas, hallándose el genotipo F restringido a América Central y del Sur, y el genotipo H a América Central y del Norte (Arauz-Ruiz et al., 1997; Piñeiro y Leone et al., 2003; Di Lello et al., 2009).

En nuestro país, la prevalencia del HBV es considerada baja (menor al 2 %) (Paraná y Almeida, 2005). El reporte epidemiológico del “programa nacional para el control de las hepatitis virales” informó una prevalencia del anti-HBc del 2,08 % y una positividad del HBsAg del 0,15 % en dadores de sangre, en el año 2009 (González, 2009). Por otra parte, la distribución de genotipos varía en las diferentes regiones de la Argentina. En la ciudad de Buenos Aires, los genotipos F, A y D son los más prevalentes, mientras que en el norte del país, así como en la ciudad de Mar del Plata, el genotipo más prevalente es el genotipo F, particularmente los subgenotipos F1b y F4 (França et al., 2004; Barbini et al., 2013). La distinta distribución de genotipos de HBV en las diferentes regiones de la Argentina, indicaría que la epidemiología actual de la infección por HBV es el resultado de los diversos movimientos migratorios humanos que han dado forma a la población actual en el país.

A pesar de que el genotipo F es el genotipo autóctono de las Américas y, uno de los principales genotipos circulantes en nuestro país, la caracterización biológica y molecular de este genotipo ha sido escasamente abordada hasta el momento. Son necesarios estudios que permitan profundizar el entendimiento actual de este particular genotipo en las hepatitis crónicas B, aportando datos que repercutan sobre la evolución de la infección y el tratamiento de los pacientes de nuestra región.

### **1.11. Variabilidad genómica del HBV**

Dado que la replicación del HBV involucra una transcripción reversa y que la polimerasa viral carece de la función de corrección de errores, el *rate* de mutación del HBV es mayor al de otros virus con genoma de ADN. Sin embargo, la superposición de los ORFs en el genoma viral restringe la posibilidad de fijación de las mutaciones generadas, dado que una única mutación podría producir variaciones fenotípicas en dos proteínas diferentes, con la consiguiente alteración en su actividad biológica. Esto origina que el HBV presente tasas de sustitución nucleotídicas intermedias ( $1,4-7,9 \times 10^{-5}$  sustituciones/sitio/año), entre los virus de ARN ( $10^{-3}-10^{-4}$  sustituciones/sitio/año) y de ADN ( $10^{-7}-10^{-9}$  sustituciones/sitio/año) (Osioy et al., 2006). Como consecuencia de esta variabilidad, el virus circula en el huésped como una mezcla compleja de variantes genómicas altamente

relacionadas, o cuasiespecie. La distribución de cuasiespecies en un paciente infectado evoluciona a lo largo de la infección crónica según la presión evolutiva de diversos factores, como la respuesta inmunológica y el tratamiento antiviral (Domingo et al., 2012).

#### 1.11.a. Variantes del promotor basal del core

Entre las mutaciones de importancia clínica del HBV asociadas a los mecanismos de patogenia de la enfermedad, se encuentran las mutaciones del promotor basal del core (BCP: *basal core promoter*). El BCP (nt 1742-1849) juega un rol importante en la replicación del HBV, debido a que dirige la iniciación de la transcripción del preCore y del ARNpg. El BCP se superpone con el extremo 3' del ORF X y con el extremo 5' de la región del preCore (Figura 7), y contiene elementos en *cis* que pueden dirigir independientemente la transcripción del ARNm del preCore y del ARNpg (Buckwold et al., 1996). Además, el BCP contiene varios sitios de unión que son reconocidos por numerosos miembros de la superfamilia de receptores nucleares, incluyendo el factor nuclear de hepatocitos 4 (HNF4) y el heterodímero receptor  $\alpha$  proliferador de peroxisomas activado–receptor  $\alpha$  retinoide X (PPAR $\alpha$ -RXR $\alpha$ ) y una serie de factores de transcripción como CCAAT/proteína de unión aumentada (C/EBP), para regular la transcripción del ARN del preCore y del Core (Yu y Mertz, 1997; Zheng et al., 2004).

La mutación del BCP más frecuentemente encontrada es la doble sustitución en A1762T y G1764A (Figura 7). Experimentos de transfección han demostrado que esta doble mutación reduce la transcripción del ARN del preCore y, por lo tanto, la expresión del HBeAg. Además, esta doble mutación aumenta moderadamente la replicación del genoma viral mediante la sobre regulación de los niveles del ARNpg (Buckwold et al., 1996; Moriyama et al., 1996; Scaglioni et al., 1997). Debido a que estas mutaciones disminuyen la expresión del HBeAg hasta en un 70 %, se encuentran más comúnmente en pacientes HBeAg negativos (y anti-HBe positivos) que en pacientes HBeAg positivos (Tong et al., 2013).

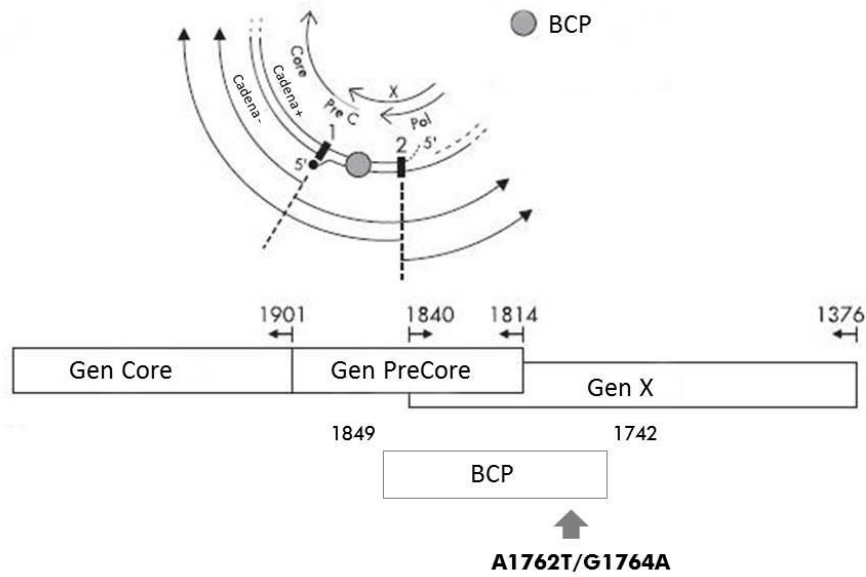
Los cambios en el BCP son seleccionados durante el curso natural de la infección crónica por HBV y su aparición se asocia a la patogénesis de la infección. Numerosos estudios han demostrado que estas mutaciones se encuentran presentes con alta frecuencia en pacientes con hepatitis crónica, hepatitis fulminante y con HCC y en menor proporción en portadores inactivos y en pacientes inmunosuprimidos (Parekh et al., 2003; Liu et al., 2004a y b). Además, existiría una alta correlación entre la aparición de estas mutaciones y el posterior desarrollo de cirrosis y HCC en pacientes crónicos (Baptista et

al., 1999; Kao et al., 2003; Lin et al., 2005a). Por otra parte, estos cambios nucleotídicos se han asociado a una pobre respuesta a la terapia con interferón en pacientes con infección crónica B.

Estas variantes virales se han detectado en todos los genotipos de HBV, sin embargo se asocian con mayor frecuencia al genotipo C, siendo, muy comunes en Asia donde al menos el 50 % de los pacientes con infección crónica posee el genotipo C (Chotiyaputta y Lok, 2009). Por otro lado, algunos estudios han demostrado que pacientes con hepatitis crónica B que poseen las mutaciones en el BCP tendrían un mayor riesgo de desarrollar resistencia antiviral a los análogos de nucleósidos/nucleótidos. Por ejemplo, Amini-Bavil-Olyaei y colaboradores (2009) revelaron que las mutaciones en el BCP aumentarían la replicación deficiente del mutante resistente a tenofovir rtA194T.

Debido a la superposición de los marcos abiertos de lectura en el genoma del HBV, las mutaciones en el BCP también afectan al gen X, y por consecuencia, a HBV-X. La doble mutación A1762T/G1764A en el BCP resulta en la sustitución de lisina por metionina en el codón 130 de HBV-X (K130M), y en la sustitución de valina por isoleucina en el codón 131 (V131I), respectivamente.

A pesar de la gran cantidad de estudios realizados sobre el BCP, que relacionan estas mutaciones a la patogénesis de la enfermedad, hasta el momento son escasos los estudios de caracterización biológica de estas variantes de HBV-X. Debido a las múltiples funciones asignadas a esta proteína, se deduce que los cambios en distintos aminoácidos podrían tener implicancias sobre la actividad biológica de la misma y, consecuentemente, en la patogenia de la infección crónica B.



**Figura 7.** Esquema parcial de la organización del genoma del HBV incluyendo las regiones codificantes del Core, preCore y el gen X. Se muestra la localización del BCP, la doble mutación en A1762T/G1764A y la superposición con el gen X.

## 2. APOPTOSIS

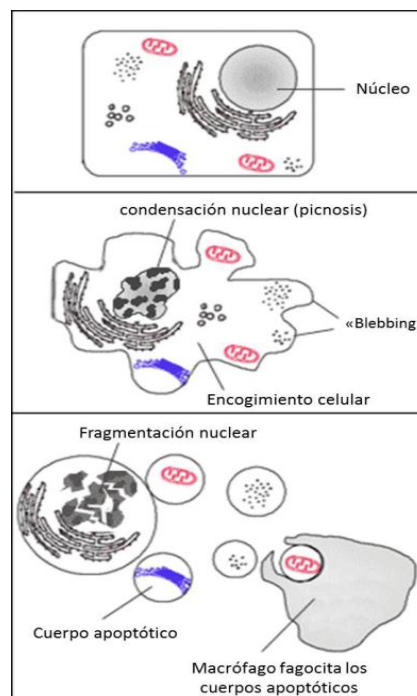
### 2.1. Características generales

La apoptosis, o muerte celular programada, es el proceso mediante el cual las células individuales de un organismo multicelular se autodestruyen en respuesta a una gran variedad de estímulos. El término “*apoptosis*” fue introducido por Kerr (Kerr et al., 1972), para definir una muerte celular regulada con características morfológicas distintas a la muerte celular por necrosis. Es un proceso de vital importancia en el desarrollo, en la diferenciación, proliferación/homeostasis, en la regulación y función del sistema inmune y en la remoción de células dañadas y/o infectadas. La apoptosis se encuentra altamente regulada y fallas en dicha regulación pueden llevar al desarrollo de ciertas condiciones patológicas incluyendo: cáncer, enfermedades autoinmunes, neurodegeneración, enfermedades isquémicas y la propagación de infecciones virales (Meier et al., 2000).

Durante el proceso apoptótico tiene lugar la pérdida de contacto entre células vecinas (debido a la carencia de elementos de superficie como las microvellosidades y a la pérdida de uniones célula-célula), el burbujeo (“*blebbing*”) de la membrana plasmática, la disminución del volumen celular (condensación citoplasmática) y la condensación y

marginación de la cromatina (picnosis nuclear) (Figura 8). Estas alteraciones morfológicas están acompañadas por diferentes eventos bioquímicos, tales como la translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática (señal de reconocimiento de la célula apoptótica para su degradación por parte de los macrófagos), la activación de una familia de cisteína-proteasas (caspasas) que degradan numerosos sustratos celulares y de endonucleasas que clivan al ADN. Una de ellas, denominada ADNasa activada por caspasas, cliva al ADN a nivel de los nucleosomas originando fragmentos de entre 180-200 pb y múltiplos de ellos. De este modo, cuando el ADN proveniente de células apoptóticas se analiza mediante electroforesis en geles de agarosa, se observa un característico patrón en escalera (*“ladder”*), frecuentemente utilizado como marcador bioquímico de este tipo de muerte (Saraste y Pulkki, 2000; Ziegler y Groscurth, 2004).

Durante la apoptosis la integridad de las organelas y de la membrana plasmática se mantiene. Las células apoptóticas terminan fragmentándose en vesículas recubiertas de membrana, llamadas cuerpos apoptóticos, los cuales son finalmente reconocidos y fagocitados por los macrófagos. De esta manera, se previene la liberación del contenido citoplasmático al medio extracelular y se evita la iniciación de una respuesta inflamatoria (Saraste y Pulkki, 2000; Ziegler y Groscurth, 2004) (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema de las características morfológicas de la muerte celular por apoptosis.

## 2.2. Vías de señalización

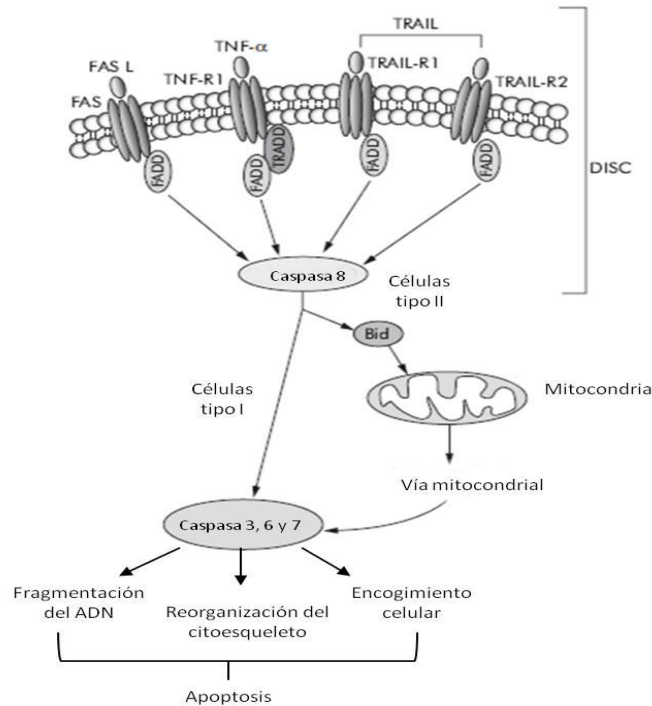
El proceso apoptótico puede ser activado por una gran variedad de estímulos tanto extra e intracelulares, como son: la unión de ligandos a receptores de superficie específicos, el daño en el ADN producido por defectos en los mecanismos de reparación, el tratamiento con drogas citotóxicas o la irradiación, por la falta de señales de supervivencia, la desregulación del ciclo celular, o por señales de muerte durante el desarrollo. Estos estímulos de diversos orígenes disparan dos vías principales de señalización apoptótica: la vía extrínseca o de receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial, que conducen a la célula a presentar las características morfológicas típicas del proceso apoptótico.

### 2.2.a. Vía extrínseca o de receptores de muerte

La vía apoptótica extrínseca está mediada por la activación de los “receptores de muerte” o receptores transmembrana que transmiten las señales apoptóticas luego de la unión con sus ligandos específicos. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) e incluyen: TNFR-1, Fas/CD95 y los receptores TRAIL DR-4 y DR-5. Los miembros de esta familia presentan dominios extracelulares ricos en cisteínas, los cuales les permiten reconocer a sus ligandos específicamente (TNF- $\alpha$ , FasL, TRAIL/APO-2L, respectivamente), resultando en la trimerización y activación de los mismos (Ashkenazi, 2002). Una vez activados, los receptores reclutan una serie de moléculas, mediante una secuencia conservada denominada dominio de muerte (DD), que incluyen a la proteína adaptadora FADD (o TRADD), la proteína quinasa Rip y la pro-caspasa 8, dando lugar a la formación del complejo DISC (*death inducing signaling complex*). En este complejo, la acumulación de varias moléculas de procaspasa-8 lleva a su activación por autocatálisis. Una vez activada, la caspasa 8 cliva y activa a las caspasas efectoras 3, 6 y 7, las cuales a su vez clivan a una gran variedad de proteínas celulares, desencadenando la muerte de la célula (Sartorius, et al., 2001) (Figura 9).

Aquellas células en las cuales la caspasa 8 tiene la capacidad de activar directamente a las caspasas efectoras 3, 6 y 7, reciben el nombre de células tipo I. En las células tipo II, la señal proveniente de la activación del receptor no genera una cascada lo suficientemente fuerte como para activar a las caspasas efectoras. En estas células, la señal es amplificada mediante la vía apoptótica mitocondrial. El nexo entre estas dos vías es la proteína perteneciente a la familia de proteínas de Bcl-2, Bid. La proteína Bid es clivada por la caspasa 8, dando lugar a su forma truncada, t-Bid, la cual se transloca hacia

la mitocondria y activa la vía intrínseca, llevando finalmente a la activación de las caspasas efectoras que ejecutan el proceso de apoptosis (Luo et al., 1998) (Figura 9).



**Figura 9.** Vía apoptótica extrínseca o de receptores de muerte.

### 2.2.b. Vía intrínseca o mitocondrial

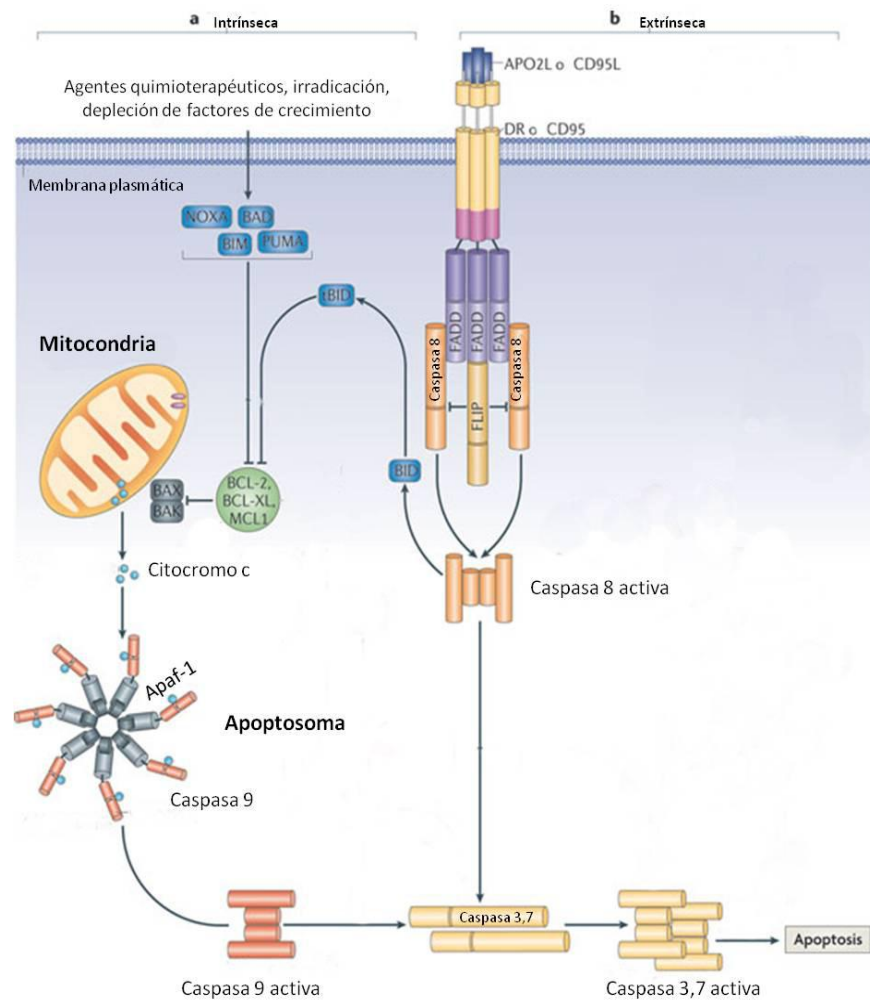
La vía intrínseca o mitocondrial es iniciada por estímulos provenientes de la misma célula como el daño al ADN, la deprivación de factores de crecimiento, el estrés oxidativo, o el estrés del retículo endoplásmico. Esta vía se encuentra regulada por la familia de proteínas de Bcl-2 las cuales se dividen en tres grupos de acuerdo a la presencia de dominios de homología a Bcl-2 (BH). Uno de estos grupos está formado por miembros anti-apoptóticos y, los dos restantes por miembros pro-apoptóticos. Los anti-apoptóticos contienen cuatro dominios BH (BH 1-4) e incluyen a las proteínas Bcl-2, Bcl-X, Bcl-w y Mcl-1. Dentro de los pro-apoptóticos se encuentran las “*multi-BH domains*,” que poseen tres dominios BH (BH1-3), e incluyen miembros como Bax y Bak. Además, otras proteínas pro-apoptóticas son las “*BH3-only*,” las cuales presentan un único dominio BH (BH3) e incluyen a Bad, Bid, Bim, Bmf, Noxa, Puma, entre otras (Borner, 2003).

Los miembros de la familia de Bcl-2 tienen la capacidad de formar homo y heterodímeros y de esta manera ejercen su función reguladora del proceso apoptótico. Por ejemplo, los miembros pro-apoptóticos Bax y Bak pueden heterodimerizar con los



anti-apoptóticos Bcl-2 o Bcl-X y de esta forma bloquear su acción. Contrariamente, las proteínas anti-apoptóticas pueden secuestrar e inhibir a las pro-apoptóticas. Por esta razón, se propone que es la relación o el balance final entre los niveles de expresión de proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 lo que determinaría la susceptibilidad de una célula a la muerte por apoptosis. De este modo, cuando las proteínas Bcl-2 o Bcl-X están en exceso, las células estarían protegidas de la muerte celular, por el contrario si lo están Bax o Bak, la célula estaría destinada a morir por apoptosis (Chipuk et al., 2010).

Las proteínas "*BH3-only*" son las iniciadoras de la cascada de señalización. Estas proteínas permanecen inactivas y son activadas por varios mecanismos como: aumento en la transcripción (Noxa, Puma, Bax), defosforilación (Bad), relocalización subcelular (Bim, Bmf) o proteólisis (Bid), en respuesta a distintos estímulos apoptóticos. Una vez activadas estas proteínas se unen e inactivan a las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X, llevando a la liberación y activación del otro grupo de proteínas pro-apoptóticas, Bax y Bak. Bax está presente en el citoplasma de la célula, pero luego de su activación se transloca hacia la membrana mitocondrial externa en donde, junto con Bak, se insertan en la membrana mitocondrial y se oligomerizan. En consecuencia se produce la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, mediante la apertura de un poro mitocondrial (MPTP), compuesto por el VDAC, el translocador de nucleótidos de adenina y la ciclofilina D, y/o por la formación de poros por las mismas proteínas (Kroemer et al., 2008). La permeabilización de la membrana mitocondrial lleva a la liberación de numerosas proteínas de la fracción intermitocondrial, entre las cuales se encuentra el citocromo c. Una vez liberado al citosol, el citocromo c se une a la proteína Apaf-1 (*apoptosis activating factor-1*) y a la pro-caspasa 9, en presencia de deoxiadenosina trifosfato (dATP), formando el apoptosoma (complejo heptamérico de alto peso molecular). Dentro del apoptosoma, la pro-caspasa 9 es activada por autocatálisis y cliva y activa a las caspasas efectoras 3, 6 y 7, las cuales desencadenan los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis (Salvesen y Renatus, 2002) (Figura 10).



**Figura 10.** Vías apoptóticas intrínseca (a) y extrínseca (b).

### 2.3. Apoptosis y HBV-X

Un gran número de estudios han evaluado el impacto de la expresión de HBV-X sobre la modulación de las vías apoptóticas, sin embargo los resultados obtenidos por los distintos investigadores han sido discordantes. Se ha demostrado que HBV-X puede afectar el proceso apoptótico de diversas formas: inducir, inhibir o no tener efecto, según los múltiples sistemas celulares que se observen. Además, algunos estudios han demostrado que HBV-X no induce directamente la apoptosis, sino que sensibiliza a las células a estímulos pro-apoptóticos en ciertos tipos celulares. Probablemente la discordancia acerca de los efectos de HBV-X sobre la muerte celular por apoptosis refleja diferencias, en los sistemas utilizados para estos ensayos. Por ejemplo, se debe considerar si las células expresan de manera transiente o constitutiva a la proteína, lo que podría facilitar la adaptación a las actividades de HBV-X, y si los hepatocitos de los ratones transgénicos

expresan la proteína al momento del análisis o se han adaptado a la expresión continua de HBV-X durante el desarrollo del hígado. También se debe tener en cuenta los niveles de expresión de HBV-X en los sistemas, los cuales pueden afectar los resultados acerca de la actividad biológica de la proteína. Además, algunos de los trabajos que analizan los efectos de HBV-X sobre la apoptosis celular se han realizado en líneas celulares no hepáticas y, debido a que HBV no infecta este tipo de células, la relevancia de las conclusiones de estos estudios es cuestionable.

### **2.3.a. HBV-X estimula la apoptosis**

Numerosos estudios han demostrado la capacidad de HBV-X de inducir el proceso apoptótico. Por ejemplo, se ha reportado que células de la línea Huh-7 que expresan HBV-X muestran un aumento en la fragmentación del ADN, una pérdida del potencial de membrana mitocondrial, y un aumento en la liberación de citocromo c mitocondrial al citosol, sugiriendo que HBV-X induce la apoptosis en esta línea celular (Takada et al., 1999). Además, se ha demostrado un aumento en los niveles citosólicos de citocromo c, en la actividad de caspasa 3 y la fragmentación nuclear en células HeLa y HepG2 que expresaban HBV-X (Chami et al., 2003). Por otra parte, diversos trabajos han reportado que la localización mitocondrial de HBV-X lleva a la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) causando la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, y consecuentemente, la inducción del proceso apoptótico en células HepG2 y Huh-7. También se ha demostrado que la sobre-expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-X o el tratamiento con secuestradores de ROS previene la muerte celular inducida por HBV-X. Por otra parte, otro trabajo también demostró que la función del activador transcripcional de HBV-X no se requería para la inducción de la apoptosis en estas células, debido a que mutantes truncadas de HBV-X localizadas en la mitocondria y que habían perdido su actividad transactivadora eran suficientes para causar la despolarización de la membrana conduciendo a la apoptosis (Shirakata y Koike, 2003).

Por el contrario, los resultados de otro trabajo mostraron que HBV-X no induce directamente la apoptosis de células Chang y HepG2, sino que las sensibiliza para la apoptosis mediada por TNF- $\alpha$ , a través la activación de la vía JNK. Los resultados de este estudio demostraron que la localización de la proteína es importante para su capacidad de sensibilizar a las células a la apoptosis mediada por TNF- $\alpha$ , ya que la proteína nuclear no era capaz de inducir el proceso de apoptosis (Su y Schneider, 1997). Kim y Seong (2003) han reportado que HBV-X sensibiliza células Chang y HepG2 a concentraciones sub-

apoptóticas de TNF- $\alpha$ . En este estudio, las células HepG2 fueron más resistentes a la apoptosis mediada por HBV-X que las células Chang, lo que demuestra el impacto de las diferencias biológicas específicas de cada tipo celular. Además, el aumento en la apoptosis fue asociado a la inhibición de la actividad de la proteína inhibitoria celular tipo FLICE (c-FLIP) y a la activación de caspasa 8 mediada por HBV-X.

Otro grupo examinó el efecto de la expresión de HBV-X sobre la apoptosis en células Hep3B. La transfección transiente de la proteína, con o sin el agregado de TNF- $\alpha$ , indujo la apoptosis en estas células, en tanto que la co-expresión con la proteína anti-apoptótica Bcl-X inhibía el efecto. Además, la transfección con cantidades crecientes del plásmido conteniendo el gen X mostró un aumento de la apoptosis, sugiriendo que el porcentaje de células que entran en apoptosis es dependiente de los niveles de expresión de HBV-X (Miao et al., 2006).

Por otro lado, varios grupos han utilizado líneas celulares transfectadas de manera estable con HBV-X para examinar el efecto de la proteína en el proceso de apoptosis. Lee y colaboradores (2004) monitorearon la apoptosis en células HepG2 transfectadas de manera estable, y observaron que HBV-X no afectaba directamente la apoptosis. Sin embargo, el tratamiento de las células transfectadas con vitamina K3, la cual que puede inducir la apoptosis, sensibilizaba a las células a la despolarización de la membrana mitocondrial y a la apoptosis. Otro grupo examinó el efecto de la expresión de HBV-X en células Chang, las cuales expresaban de manera estable la región N-terminal de la hemaglutinina del *Influenza virus* acoplada a HBV-X bajo el control del promotor del virus simiano 40 (SV40). En este estudio se generaron 3 líneas, cada una de las cuales expresaba diferentes niveles de HBV-X con distintos niveles de actividad transcripcional. Se observó que la línea celular con expresión de niveles intermedios de HBV-X y los mayores niveles de actividad transcripcional presentaba una sensibilización a la apoptosis inducida por estaurosporina o cicloheximida. Sin embargo, altos o bajos niveles de expresión de HBV-X no producían dicha sensibilización (Bergametti et al., 1999). Estudios adicionales en células HepG2 que expresaban HBV-X y eran crecidas en ausencia de suero demostraron que HBV-X induce la translocación de Bax hacia la mitocondria y que podría interactuar directamente con Bax (Kim et al., 2008).

### **2.3.b. HBV-X inhibe la apoptosis**

Por otro lado, numerosos estudios muestran que HBV-X también tiene la capacidad de inhibir del proceso apoptótico. Por ejemplo, se ha demostrado que HBV-X puede inhibir la

muerte celular inducida por Fas en hepatocitos humanos primarios (Diao et al., 2001). Otro estudio sugiere que la expresión de HBV-X en células HepG2 puede protegerlas parcialmente de la apoptosis inducida por Fas, debido a la activación de NF- $\kappa$ B mediada por HBV-X (Pan et al., 2001). Además se demostró que la expresión transiente de HBV-X inhibe la apoptosis en células Chang serodeprivadas y tratadas con los inductores de apoptosis estaurosporina o etopósido. En este estudio, la habilidad de HBV-X para bloquear la apoptosis se debía a la activación sobre la vía de fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) (Lee et al., 2001b). Un estudio similar realizado en células Hep3B transfectadas de manera estable con HBV-X también demostró que HBV-X puede inhibir la apoptosis inducida por TGF- $\beta$  mediante una vía dependiente de PI3K (Shih et al., 2000). Además, Kang-Park y colaboradores (2006) demostraron que HBV-X era capaz de activar la vía PI3K e inhibir la apoptosis disminuyendo la expresión de la fosfatasa PTEN en células Chang. También se ha reportado que HBV-X puede inhibir la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  o por anticuerpos anti-Fas, mediante la inhibición de la actividad de caspasa-3 en fibroblastos de rata y en células de hepatoma (Gottlob et al., 1998b). En estos trabajos, la actividad anti-apoptótica de HBV-X fue atribuida a dos dominios tipo Kunitz putativos presentes en la secuencia de la proteína. Estudios *in vitro* realizados en extractos de células HepG2 han sugerido que HBV-X podría formar un complejo multi-proteico con la proteína anti-apoptótica survivina capaz de suprimir la activación de caspasas, sin embargo, esta actividad de HBV-X y su significancia funcional no han sido probadas *in vivo* (Marusawa et al., 2003). Finalmente, los resultados de otro estudio han demostrado que la inducción de la apoptosis en hepatocitos en los cuales hay producción de viriones de HBV, resulta en la liberación de partículas virales no envueltas con menor infectividad. La expresión de HBV-X o la replicación de HBV por si solas no resultaban en la sensibilización de los hepatocitos a la muerte por apoptosis. Además, la inhibición de la apoptosis mediada por HBV se requería para la liberación de partículas infectivas, sugiriendo que la función anti-apoptótica de HBV-X en hepatocitos normales tendría un rol importante durante la replicación de HBV (Arzberger et al., 2010).

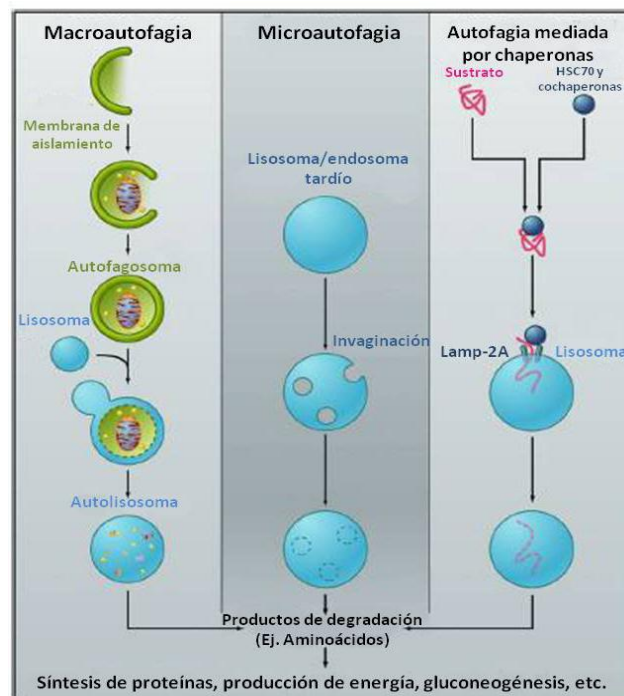
Si bien son numerosos los estudios de caracterización de la función de HBV-X en la inducción y/o la inhibición de la apoptosis, son inexistentes los correspondientes a los subgenotipos de mayor prevalencia en la región. Hasta el momento, se desconoce el efecto que las HBV-X con distintas duplas aminoacídicas en 130 y 131 de los subgenotipos F1b y F4 tendrían sobre la modulación de este proceso.

### 3. AUTOFAGIA

#### 3.1 Características generales

El término autofagia deriva de las raíces griegas “auto” (uno mismo) y “phagos” (comer), y hace referencia al proceso catabólico celular en el cual material citoplasmático, incluyendo organelas, es transportado a los lisosomas para su degradación. El término autofagia ha sido propuesto en 1963 por Christian de Duve para describir el fenómeno asociado con vesículas de simple o doble membrana que contenían citoplasma y organelas, en varias etapas de digestión.

Actualmente se definen tres tipos de autofagia: la autofagia mediada por chaperonas, la microautofagia y la macroautofagia. En la autofagia mediada por chaperonas, proteínas mal plegadas conteniendo la secuencia consenso KFERQ son reconocidas por la chaperona citosólica Hsc70 y cochaperonas, y luego son translocadas a la membrana lisosomal en donde son reconocidas por el receptor LAMP-2, resultando en el desplegamiento de las proteínas y su degradación. En la microautofagia los componentes citosólicos son secuestrados por la invaginación directa de las membranas lisosomales o de los endosomas tardíos, para su degradación (Mizushima y Komatsu, 2011). La macroautofagia, denominada simplemente autofagia es la que se describe a continuación (Figura 11).



**Figura 11.** Diferentes tipos de autofagia.

La autofagia es un proceso intracelular, conservado desde levaduras hasta mamíferos, que cumple funciones importantes en el mantenimiento de la homeostasis celular y en la supervivencia de la célula en condiciones de estrés (Mizushima y Komatsu, 2011). Es un proceso catabólico en el cual proteínas citoplasmáticas y organelas son secuestradas en vesículas de doble membrana, conocidas como autofagosomas, y enviadas a los lisosomas para su degradación (Levine y Kroemer, 2008).

Luego de la inducción del proceso autofágico, un pequeño saco vesicular, denominado fagóforo o membrana de aislamiento, se elonga y engloba una porción del citoplasma, resultando en la formación del autofagosoma. Posteriormente, la membrana externa del autofagosoma se fusiona con los lisosomas, formando un autolisosoma, lo que conduce a la degradación del contenido de la vesícula junto con la membrana interna del autofagosoma. Los aminoácidos y otras pequeñas moléculas generadas por la degradación autofágica son liberados nuevamente al citoplasma para ser reciclados o para la producción de energía (Figura 10). El origen de la membrana del fagóforo es discutible, sin embargo varios estudios han demostrado que el retículo endoplásmico, la mitocondria y la membrana plasmática servirían como fuente para la formación de la membrana de aislamiento (Mizushima et al., 2010).

Bajo condiciones fisiológicas, la autofagia posee funciones fundamentales como el mantenimiento del “pool” de aminoácidos en condiciones de déficit de nutrientes, en la prevención de la neurodegeneración, en la supresión de tumores, en la eliminación de microorganismos intracelulares y en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa (Cecconi y Levine, 2008; Deretic y Levine, 2009). Una característica distintiva del proceso autofágico es su regulación dinámica, debido a que la actividad autofágica es usualmente baja en condiciones basales, pero puede aumentarse por numerosos estímulos. El inductor más conocido del proceso autofágico es la deprivación de nutrientes, pero también puede ser activada por otros estreses fisiológicos (hipoxia, falta de energía, elevada temperatura, estrés del retículo endoplásmico), estimulación hormonal, agentes farmacológicos (rapamicina), señales de la respuesta inmune innata, y en ciertas enfermedades como infecciones virales, bacterianas y parasitarias, pancreatitis aguda, enfermedades cardíacas y enfermedades que producen agregados proteicos. A su vez, la supresión del proceso autofágico puede asociarse a diversas enfermedades como ciertos tipos de cáncer, desórdenes neurológicos, enfermedades infecciosas y trastornos inflamatorios del intestino y, una disminución en la función autofágica es una característica común del envejecimiento (Mizushima et al., 2010).

### 3.2. Regulación del proceso autofágico

La ejecución del proceso autofágico involucra un conjunto de genes evolutivamente conservados conocidos como proteínas Atg. El proceso de autofagia puede ser dividido en cuatro pasos ejecutados por proteínas Atg específicas (Levine y Kroemer, 2008) (Figura 12). El primer paso consiste en la inducción y nucleación de la vesícula. La quinasa mTOR (*target* de rapamicina de mamífero), principal controlador de la traducción cap-dependiente en las células, inhibe fuertemente el proceso autofágico. En presencia de nutrientes, mTOR se asocia al complejo proteico ULK1-Atg13-FIP200 y fosforila a la serina-treonina quinasa ULK1, impidiendo la expansión de la membrana de aislamiento. Ante una privación de nutrientes, o en presencia de rapamicina, se inhibe la asociación de mTOR con el complejo ULK1, lo que mantiene a ULK1 defosforilada. De esta manera, ULK1 se activa y fosforila a Atg13 y FIP200, iniciándose así el proceso autofágico (Kim y Lee, 2014). La activación del complejo ULK1, recluta al complejo Beclina-1-Vps34 a la membrana de aislamiento, mediante la fosforilación de Beclina-1. Vps34 es una PI3K de clase III, que promueve la formación de fosfatidilinositol-3 fosfato (PI3P) a partir de fosfatidilinositol (PI). El PI3P producido recluta a la proteína efectora DFCP1, promoviendo la nucleación de la vesícula doble membrana (Mizushima et al., 2011).

El segundo paso del proceso autofágico involucra la elongación de la membrana de aislamiento para formar el autofagosoma. Dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina median este paso. En el primer sistema, las enzimas Atg7 (*E1-like*) y Atg10 (*E2-like*) promueven la asociación covalente de Atg12 con Atg5. Luego Atg16 se asocia a estas proteínas para formar el complejo heterotrimérico Atg16-Atg12-Atg5, que se une a la membrana externa del autofagosoma en crecimiento, promoviendo su curvatura. El segundo sistema tipo ubiquitina resulta en el clivaje de la proteína asociada a microtúbulos LC3 (*Light Chain 3*) por acción de Atg7 y la proteasa Atg4. Luego del clivaje, la enzima Atg3 (*E2-like*) adiciona una molécula de fosfatidiletanolamina (PE) a un residuo de glicina conservado en el extremo C-terminal de la proteína clivada para formar a LC3-II o LC3-PE. LC3 es una proteína soluble dispersa en el citoplasma, pero luego de su clivaje y lipidación, LC3-II se asocia a las membranas interna y externa del autofagosoma en crecimiento, donde también, promueve su curvatura. Una vez completado el autofagosoma, Atg9 y Atg18 remueven y reciclan a Atg16, Atg12 y Atg5, junto con la proteína LC3-II presente en la membrana externa, mientras que la LC3-II asociada a la membrana interna es retenida. Por esta razón, se utiliza a la proteína LC3-II como marcadora de la formación de autofagosomas (Kudchodkar y Levine, 2009).



El tercer paso del proceso implica el acoplamiento y la fusión del autofagosoma con los lisosomas para formar el autolisosoma. Este proceso no está completamente esclarecido, pero se cree que la proteína lisosomal LAMP-2 y la proteína de unión a GTP Rab-7 estarían involucradas en este paso (Levine y Kroemer, 2008).

El último paso del proceso autofágico es la ruptura y la degradación de la vesícula. Luego de la fusión de la membrana externa del autofagosoma con la membrana lisosomal, las enzimas catepsinas B, D y L, y otras enzimas lisosomales degradan la membrana interna, junto con los componentes englobados dentro de la vesícula. Los productos de esta degradación (aminoácidos y lípidos), son exportados del autolisosoma hacia el citoplasma, donde son reciclados para generar nuevas macromoléculas (Kudchodkar y Levine, 2009).

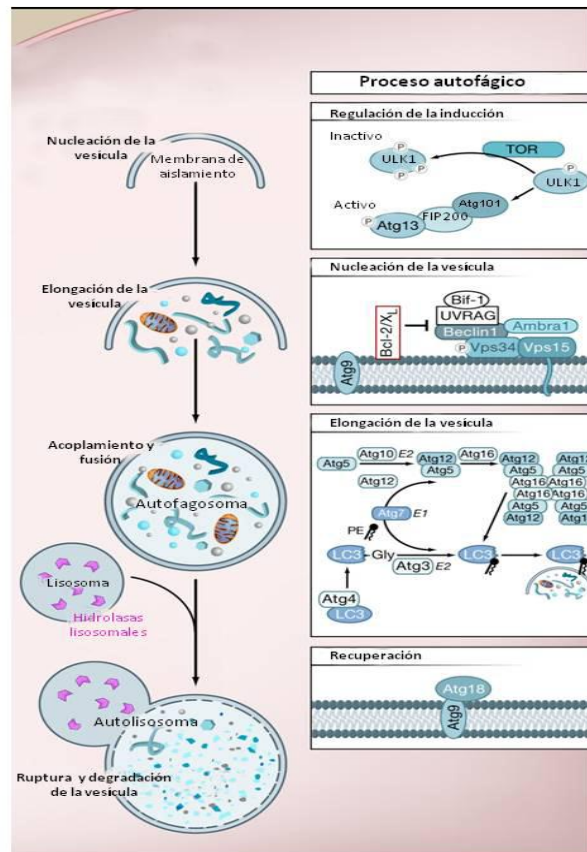


Figura 12. Regulación del proceso de autofagia.

### 3.3. Los virus y el proceso autofágico

La autofagia puede funcionar como un proceso no selectivo, en el cual se degradan componentes citoplasmáticos para el mantenimiento de la homeostasis celular, o como un proceso altamente selectivo, en el cual moléculas adaptadoras reconocen

específicamente ciertos componentes celulares para su degradación. En particular, la eliminación selectiva de microorganismos intracelulares mediante autofagia recibe el nombre de xenofagia. A través del proceso de xenofagia los viriones o ciertos componentes virales son marcados, englobados en los autofagosomas y finalmente degradados en los lisosomas. Sin embargo, varios virus han desarrollado estrategias para modular directa o indirectamente el proceso de autofagia para promover su supervivencia en las células del huésped (Chiramel et al., 2013).

Ciertos virus han desarrollado estrategias para interferir con la formación del autofagosoma y su maduración. Por ejemplo, la proteína ICP34.5 del herpes simplex virus tipo 1 (HSV-1) y los homólogos virales de Bcl-2 del gama herpes virus ( $\gamma$ HV) y del virus del sarcoma de Kaposi (KSHV), se unen e inactivan a la proteína Beclina-1, impidiendo la formación del autofagosoma (Orvedahl et al., 2007; Ku et al., 2008). Otros virus como el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), el *Influenza A virus*, coxackievirus B3 y poliovirus, inhiben la autofagia bloqueando la maduración del autofagosoma o su degradación. Se ha visto que las proteína Nef del HIV y la M2 del *Influenza A virus*, bloquean la maduración del autofagosoma mediante un mecanismo que depende de su interacción con Beclina-1 (Gannagé et al., 2009; Kyei et al., 2009).

Por otro lado, otros virus son capaces de inducir el proceso autofágico, para promover la replicación viral. La replicación viral puede generar respuestas de estrés, como estrés del retículo endoplásmico o la producción de ROS, las cuales inducen el proceso autofágico. La acumulación de proteínas virales plegadas anormalmente en el retículo endoplásmico, activa en la célula la respuesta a proteínas desplegadas (UPR: *unfolded protein response*), mediada por tres proteínas asociadas a la membrana del retículo endoplásmico: PERK, ATF6 e IRE1. Ciertos estudios han demostrado que la replicación del HCV en los hepatocitos infectados induce estrés en el retículo endoplásmico, activando a las proteínas PERK, ATF6 e IRE1, y desencadenando el proceso autofágico. Además, el silenciamiento de estas tres proteínas no sólo resultaba en una disminución significativa de los niveles de LC3-II, sino que además inhibía la replicación del HCV (Ke y Chen, 2011).

La mayoría de los virus de ARN de cadena positiva generan un arreglo en el sistema de membranas intracelulares, dando lugar a la formación de “fábricas” de replicación. Esta reorganización frecuentemente requiere del proceso autofágico. Se ha demostrado que los complejos de replicación-transcripción de poliovirus, coronavirus y rotavirus se encuentran anclados en estructuras tipo autofagosomas de doble membrana,

asociados a la forma lipidada de la proteína LC3 (Belov et al., 2007; Miller y Krijnse-Locker, 2008).

Además de una contribución directa en la formación de plataformas membranosas de replicación, la autofagia puede promover la replicación viral de otras maneras. Un estudio demostró que la infección de hepatocitos con el virus del dengue induce la degradación autofágica de gotas lipídicas (lipofagia), resultando en la movilización de triglicéridos que son utilizados para producción de ATP vía  $\beta$ -oxidación (Heaton y Randall, 2010). Por otro lado, se ha visto que la autofagia estaría involucrada en la liberación no lítica de los picornavirus. Se ha demostrado que la inhibición farmacológica o el silenciamiento de la expresión de factores clave de la autofagia resulta en la disminución en la producción de partículas virales infecciosas (Huang et al., 2009).

Por último, estudios recientes demostraron que ciertos virus pueden modular el proceso autofágico para degradar selectivamente moléculas de la respuesta inmune innata e inflamatoria. Se ha observado que la autofagia inducida por el citomegalovirus murino (MCMV) lleva a la degradación selectiva de NEMO (modulador esencial de NF- $\kappa$ B) en los lisosomas, inhibiendo la respuesta inflamatoria (Fliss et al., 2012). Por otro lado, el estudio realizado por Ke y Chen (2011) demostró que la UPR inducida por el HCV activa la vía autofágica, la cual es requerida para la replicación viral. A su vez, este aumento de la replicación se correlacionó con la supresión de la inmunidad innata antiviral. El silenciamiento de Beclina-1 y Atg7 en hepatocitos no sólo redujo la replicación del HCV, sino que también resultó en la activación de la señalización por interferón (Shrivastava et al., 2011).

### **3.3.a. Autofagia y HBV**

El HBV también sería capaz de modular el proceso autofágico para favorecer su replicación en los hepatocitos infectados. Las proteínas virales HBV-X y HBsAg estarían implicadas en este proceso. Ciertos estudios mostraron que HBV-X es capaz de inducir el proceso autofágico, ya sea mediante la unión y activación de la PI3K de clase III, Vps34 (Sir et al., 2010), o a través del aumento en la actividad del promotor de Beclina-1 (Tang et al., 2009). Por otro lado, la envoltura de las partículas virales también sería dependiente del proceso de autofagia. Li y colaboradores (2011) demostraron que hepatocitos deficientes en autofagia producen una cantidad significativamente menor de partículas virales envueltas. Además, estos autores observaron que el HBsAg se une y co-localiza con LC3-I y LC3-II durante la infección por HBV. Se cree que los autofagosomas podrían

servir como una fuente de membranas para la generación de la envoltura del virus o, alternativamente, los autofagosomas podrían ser usados para transportar a los viriones hacia el sitio donde el virus adquiere su envoltura, el retículo endoplásmico o el complejo de Golgi. Esta persistente activación de la autofagia en los hepatocitos durante la infección crónica podría jugar un rol importante en la patogénesis del HBV.

No obstante estas evidencias, hasta el momento se desconoce si las HBV-X con distintas duplas aminoacídicas en 130 y 131 de los subgenotipos más prevalentes en nuestro país inducen el proceso de autofagia en los hepatocitos y si existen diferencias moleculares en la inducción, dependientes de los subgenotipos y las variantes de HBV-X.

# OBJETIVOS



**OBJETIVOS**

La patogénesis de la infección crónica B involucra la continua muerte y proliferación de los hepatocitos en el hígado infectado. La HBV-X es una proteína regulatoria multifuncional, capaz de regular numerosos procesos biológicos, entre ellos los mecanismos de muerte y de proliferación celular. Entre las mutaciones que surgen naturalmente durante el transcurso de la infección crónica se encuentran aquellas ocurridas en el BCP las cuales, debido a la superposición de los marcos de lectura del genoma, también afectan a HBV-X en los aminoácidos 130-131. Hasta el momento se desconoce el efecto que producirían estas mutaciones sobre las diversas actividades biológicas de HBV-X. El propósito de esta tesis es caracterizar la implicancia de estas mutaciones en las actividades biológicas de HBV-X, para lo cual se plantean los siguientes objetivos:

**Objetivo general:**

Establecer las implicancias de las mutaciones en los aminoácidos 130-131 de HBV-X como marcador molecular, sobre la actividad biológica de la proteína y su consecuente relación con la patogenia de la infección crónica por HBV.

**Objetivos particulares:**

- 1) Estudiar el efecto de la presencia de distintos aminoácidos en los sitios 130-131 de HBV-X de los subgenotipos F1b y F4 sobre la viabilidad celular.
  - Analizar los cambios en el número de células totales, inducidos por la expresión de ambas formas de HBV-X en diferentes líneas de hepatoma humano.
  - Determinar la viabilidad y la mortalidad de las células transfectadas.
  
- 2) Estudiar el efecto de la presencia de distintos aminoácidos en los sitios 130-131 de HBV-X de los subgenotipos F1b y F4 sobre la inducción de la muerte celular por el mecanismo de apoptosis.
  - Evaluar la presencia de células con características morfológicas típicas de la apoptosis, como consecuencia de la expresión de HBV-X.
  - Analizar la inducción de la fragmentación típica del ADN genómico en las células que expresan HBV-X.
  - Diferenciar y cuantificar células viables, apoptóticas (tempranas y tardías) y necróticas mediante tinciones diferenciales de las células expresando

HBV-X.

- 3) Estudiar vías intracelulares de transducción de señales involucradas en la apoptosis afectadas por las distintas HBV-X de ambos subgenotipos virales.
  - Evaluar la expresión de miembros pro (Bax) y anti-apoptóticos (Bcl-X y Bcl-2) de la familia de proteínas Bcl-2, regulatorias de la apoptosis, sobre hepatocitos con expresión de HBV-X.
  
- 4) Estudiar el efecto de la presencia de las distintas HBV-X de ambos subgenotipos sobre la inducción de la autofagia.
  - Evaluar la aparición de estructuras autofágicas características (membranas de aislamiento, autofagosomas y autolisosomas) en los hepatocitos expresando HBV-X.
  - Analizar a la proteína autofágica LC3 (conversión de citoplasmática a la asociada a los autofagosomas) sobre los hepatocitos con expresión de HBV-X.

# MATERIALES Y MÉTODOS





## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. MUESTRAS

Se utilizaron muestras de suero de pacientes con infección crónica por HBV, provenientes de distintos centros de salud pública de las ciudades de Buenos Aires y Mar del Plata. Dichas muestras, habían sido previamente secuenciadas para determinar el genotipo viral y los nucleótidos presentes en 1762-1764, determinantes de los aminoácidos en las posiciones 130-131 de la HBV-X. Se seleccionaron muestras del genotipo F, subgenotipos F1b y F4, con la secuencia salvaje (A1762-G1764, K-V en 130-131) y con la secuencia mutada (T1762-A1764, M-I en 130-131).

### 2. EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN se extrajo a partir de 200 µL de suero, utilizando el kit comercial *QIAamp DNA Mini kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3. AMPLIFICACIÓN DEL GEN X MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La amplificación del gen X se realizó mediante PCR, utilizando cebadores por fuera de los codones de iniciación y de terminación de la transcripción del gen, específicos para el genotipo F (Tabla 1). La PCR se realizó colocando 10 µL del ADN purificado a la mezcla de reacción compuesta por 6,25 µL de *buffer* 10X, 200 µM dNTPs, 2 mM Cl<sub>2</sub>Mg, 25 pmol de cada uno de los cebadores, 2,5 U de la enzima Taq polimerasa (Invitrogen) y agua hasta completar un volumen final de 50 µL de reacción. La amplificación se realizó en un termociclador *PCR Sprint Thermal Cycler* (*Thermo Electron Corporation*) utilizando las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial a 94 °C 3 minutos, 36 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C y 2 minutos a 72 °C y una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Nombre	Orientación	Secuencia 5' → 3'	Posición (nucleótidos)	Tm °C
HBV65	Sentido	AGCCACCATGGCTGCTCGGTTGTGC	1367-1391	65
HBV56	Antisentido	ATTAGGCAGAGGTGAAAAG	1839-1820	49

**Tabla 1.** Cebadores utilizados en la amplificación del gen X.

La visualización de los productos de amplificación (474 pb) se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en *buffer* tris-acetato-EDTA (TAE) 1X. Para ello se sembraron en el gel 5 µL de las muestras con *buffer* de carga 6X (30 % glicerol; 0,25 % azul de bromofenol), junto a un marcador de peso molecular (CienMarker, Biodinamycs). La corrida electroforética se realizó a un voltaje constante de 100 V en *buffer* TAE 1X. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador de luz ultravioleta (UV). Se verificó que los amplicones positivos se encuentren en el peso molecular correspondiente.

#### 4. PURIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Para purificar los productos de PCR, se corrieron en un gel de agarosa al 1 % en *buffer* TAE 1X, se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz UV. Las bandas de 474 pb se escindieron del gel y se purificaron, utilizando el kit comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos purificados se eluyeron en agua.

La concentración aproximada de los productos purificados se determinó en un gel de agarosa al 1 %, comparando la intensidad de las bandas con la correspondiente de 500 pb del marcador de peso molecular, de concentración conocida (CienMarker, Biodinamycs).

## 5. CLONADO DEL GEN X EN EL VECTOR pGEM-T EASY

Los amplicones purificados se insertaron en el vector pGEM-T Easy (Promega).

### 5.1. Ligación

La ligación de los insertos en el vector se llevó a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ L: 5  $\mu$ L de *buffer* 2X, 1  $\mu$ L del plásmido pGEM-T (Promega), 1  $\mu$ L de la enzima T4 ADN ligasa (Promega) y 3  $\mu$ L de los amplicones purificados. Las mezclas de reacción se incubaron durante toda la noche a 4 °C en un termociclador *PCR Sprint Thermal Cycler* (Thermo Electron Corporation).

### 5.2. Transformación de bacterias competentes

Se transformaron *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  competentes comerciales (*Subcloning Efficiency DH5 $\alpha$  Competent Cells*, Invitrogen) con 5  $\mu$ L de las ligaciones por shock térmico (30 minutos en hielo, 90 segundos a 42 °C, 2 minutos en hielo). Se agregaron 950  $\mu$ L de medio SOC (2 % triptona; 0,5 % extracto de levadura; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM glucosa), y se incubó a 37 °C durante 1 hora 30 minutos. Se centrifugaron durante 10 minutos a 500 rpm, se resuspendieron en 100  $\mu$ L de medio SOC y se sembraron en placas de LB-agar (1 % triptona; 0,5 % extracto de levadura; 0,5 % NaCl; 0,75 % agar-agar) conteniendo X-gal (50 mg/mL, Promega) y ampicilina (100  $\mu$ g/mL), para seleccionar las bacterias transformadas. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 horas.

Se picaron las colonias blancas y se sembraron en tubos conteniendo 2 mL de medio LB (1 % triptona; 0,5 % extracto de levadura; 0,5 % NaCl) y ampicilina (100  $\mu$ g/mL), los cuales se incubaron a 37°C durante 16 horas en agitación. Se purificaron los plásmidos utilizando el *AxyPrep Plasmid Miniprep Kit* (Axygen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se eluyeron en agua.

### 5.3. Digestión con enzimas de restricción

Se chequeó la presencia del inserto correspondiente en los plásmidos purificados mediante la digestión con la enzima de restricción EcoRI. La digestión se realizó colocando 2  $\mu$ L de *buffer* H, 1  $\mu$ L de la enzima EcoRI (Promega), 7,5  $\mu$ L de los plásmidos purificados y agua hasta completar un volumen final de 20  $\mu$ L. Se incubó a 37 °C durante 4 horas. Posteriormente, todo el volumen de las digestiones se corrió en un gel de agarosa al 1 % en *buffer* TAE 1X, se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz

UV. Se observaron las bandas correspondientes al plásmido y las liberadas del inserto de 474 pb.

#### **5.4. Purificación y determinación de la concentración de los insertos**

Las bandas correspondientes a los insertos de 474 pb liberados del plásmido se escindieron del gel, se purificaron utilizando el kit comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante y se eluyeron en agua. La concentración aproximada de los insertos purificados se determinó en un gel de agarosa al 1 %, comparando la intensidad de las bandas con la correspondiente de 500 pb del marcador de peso molecular, de concentración conocida (CienMarker, Biodinamycs).

### **6. CLONADO DEL GEN X EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pcDNA3.0**

Los insertos liberados y purificados se re-clonaron en el vector de expresión en células de mamífero pcDNA3.0 (Invitrogen).

#### **6.1. Linealización del vector y tratamiento con fosfatasa alcalina**

El vector pcDNA3.0 se linealizó por digestión con la enzima de restricción EcoRI. La digestión se realizó con: 2  $\mu$ L de *buffer* H, 1,5  $\mu$ L de la enzima EcoRI (Promega), 10  $\mu$ L del plásmido pcDNA3.0 y agua hasta completar un volumen final de 20  $\mu$ L. Se incubó a 37 °C durante 4 horas.

Todo el volumen de las digestiones se corrió en un gel de agarosa al 1 % en *buffer* TAE 1X, se escindió la banda correspondiente al vector linealizado, se purificó utilizando el kit comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante y se eluyó en agua. La concentración aproximada del vector se determinó en un gel de agarosa al 1 %, comparando la intensidad de la banda con la correspondiente de 5000 pb del marcador de peso molecular, de concentración conocida (*1Kb Ladder DNA Marker*, Axygen).

Se digirió el vector linealizado con fosfatasa alcalina, agregando al mismo 1,5  $\mu$ L de TSAP (*Thermosensitive Alkaline Phosphatase*, Promega) con incubación durante 30 minutos a 37°C e inactivación durante 15 minutos a 65 °C.

## 6.2. Ligación

Para las reacciones de ligación se empleó una relación inserto:vector de 12:1 para los insertos correspondientes al gen X salvaje y mutado del subgenotipo F1b y relaciones de 6:1 y 8:1 para los insertos correspondientes al gen X salvaje y mutado del subgenotipo F4 respectivamente, utilizando 150 ng del vector. Las reacciones de ligación se realizaron en 20  $\mu$ L de volumen final: 2  $\mu$ L de *buffer* ligasa 10X, 2  $\mu$ L de la enzima T4 ADN ligasa (Promega), 5  $\mu$ L del vector pcDNA3.0 (previamente digerido con EcoRI y defosforilado) y 11  $\mu$ L de los insertos correspondientes al gen X salvaje y mutado (previamente tratados con la enzima de restricción EcoRI). Las mezclas de reacción se incubaron durante 16 horas a 4 °C en un termociclador *PCR Sprint Thermal Cycler* (Thermo Electron Corporation).

## 6.3. Transformación, digestión y secuenciación de los insertos

Con el producto de las ligaciones, se transformaron *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes, como se describió anteriormente, se sembraron en placas de LB-agar conteniendo ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y se incubaron a 37 °C durante 16 horas. De cada transformación, se picaron las colonias, se sembraron en tubos conteniendo 2 mL de medio LB y ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y se incubaron a 37 °C durante 16 horas en agitación. Se purificaron los plásmidos utilizando el *AxyPrep Plasmid Miniprep Kit* (Axygen) y se eluyeron en agua.

En los plásmidos purificados, se chequeó la presencia del inserto por digestión con la enzima de restricción EcoRI, como se describió anteriormente. Posteriormente, todo el volumen de las digestiones se corrió en un gel de agarosa al 1 % en *buffer* TAE 1X, se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz UV. Se observaron las bandas correspondientes al plásmido y las liberadas del inserto de 474 pb.

Los clones que presentaron los insertos de 474 pb, correspondientes al gen X salvaje y mutado, se secuenciaron (Macrogen Inc., Seúl, Corea) para confirmar la correcta orientación del gen y los nucleótidos presentes en las posiciones 1762-1764. La secuenciación se realizó utilizando los cebadores T7 promotor y BGH-R flanqueantes a la región de múltiple clonado.

Nombre	Orientación	Secuencia 5' → 3'	Tm °C
T7 promotor	Sentido	TAATACGACTCACTATAGGG	48
BGH-R	Antisentido	TAGAAGGCACAGTCGAGG	54

**Tabla 2.** Cebadores utilizados en la secuenciación del inserto correspondiente al gen X salvaje y mutado.

De esta manera se obtuvieron los vectores de expresión pcDNA-X\_K/V y pcDNA-X\_M/I de los subgenotipos F1b y F4 para los posteriores experimentos de transfección.

## 7. CULTIVO DE CÉLULAS

### 7.1. Líneas celulares

Se trabajó con las siguientes líneas celulares:

HepG2 (ATCC HB-8065): línea celular humana derivada de un carcinoma hepatocelular de un varón caucásico de 15 años de edad. Son células epiteliales en su morfología y secretan una variedad de proteínas plasmáticas como albúmina, transferrina, antitripsina  $\alpha$ -1, microglobulina  $\alpha$ -2 y plasminógeno.

Hep3B (ATCC HB-8064): línea celular derivada de un hepatocarcinoma humano de un niño africano de 8 años. Esta línea tiene integrado parte del genoma del HBV y expresa el antígeno de superficie del virus. Son p53 negativas.

Huh-7 (JCRB0403): línea celular de carcinoma hepatocelular proveniente de un tumor hepático de un hombre japonés de 57 años de edad.

### 7.2. Mantenimiento de los cultivos celulares

Las líneas HepG2 y Hep3B se mantuvieron en cultivo en medio mínimo esencial de Eagle (MEM, Gibco) suplementado con 10 % suero fetal bovino (Natocor), 2 mM L-glutamina

(Gibco), 0,15 % bicarbonato de sodio, 1 mM aminoácidos no esenciales (Gibco) y 1 mM piruvato de sodio (Gibco). La línea celular Huh-7 se cultivó en medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM, Sigma) suplementado con 10 % suero fetal bovino (Natocor), 0,15 % bicarbonato de sodio, 1 mM aminoácidos no esenciales (Gibco), 100 UI/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomina (Gibco). Se incubaron en estufa a 37 °C con atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub>.

## 8. TRANSFECCIÓN TRANSIENTE

La transfección transiente con los vectores de expresión pcDNA-X\_K/V y pcDNA-X\_M/I en las tres líneas celulares, se realizó utilizando el reactivo *X-treme gene HP transfection reagent* (Roche). Para ello, se crecieron células de las líneas HepG2, Hep3B y Huh-7 en botellas de 25 cm<sup>2</sup> o en placas de 24 pocillos, dependiendo del ensayo a realizar, en estufa a 37 °C con atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, hasta lograr una confluencia del 50-60 %. Se transfectó utilizando una concentración de 0,1-0,2 µg de ADN por botella o pocillo y relaciones reactivo:ADN de 2:1 para las líneas HepG2 y Huh-7 y de 1:1 para la línea celular Hep3B. Las diluciones del ADN y del reactivo de transfección se realizaron en medio D-MEM suplementado con 0,15 % bicarbonato de sodio. Se prepararon las diluciones de los plásmidos y del reactivo en tubos separados, se mezclaron e incubaron 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos. A continuación, se lavaron las células 2 veces con PBS (*buffer* fosfato salino; 136 mM NaCl; 2 mM KCl; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4), se agregó la mezcla de los complejos y se completó con medio de mantenimiento (1 % de suero fetal bovino). Las células se incubaron en estufa a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 5 horas. Transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante y se reemplazó por medio de mantenimiento fresco. Los cultivos se incubaron a 37 °C con atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub> durante 48 horas.

## 9. DETECCIÓN DEL ARNm DEL GEN X POR RT-PCR

### 9.1. Extracción de ARN total y digestión con DNAsa

La extracción de ARN total de los cultivos celulares transfectados se realizó con el reactivo Trizol (Invitrogen). Las células de las tres líneas se crecieron en placas de 24 pocillos, y se transfectaron de manera transiente con las distintas construcciones de ambos subgenotipos por 48 horas. Para la purificación del ARN, se cosecharon las células de los

distintos pocillos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos. Se resuspendió el *pellet* en 250  $\mu$ L de Trizol y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente para lisar las células. Se agregó a cada tubo 200  $\mu$ L de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C y se transfirió la fase acuosa superior a un nuevo tubo conteniendo 500  $\mu$ L de isopropanol para precipitar el ARN. Se incubó la mezcla 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g por 10 minutos a 4 °C. El *pellet* de ARN se lavó con 1 mL de etanol 75 %, centrifugando a 7500 g a 4°C durante 5 minutos y se removió el sobrenadante. El *pellet* se secó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua.

El ARN total extraído se trató con la enzima DNAsa para eliminar cualquier rastro de ADN plasmídico. La digestión se realizó colocando 1  $\mu$ L de *buffer* 10X, 1  $\mu$ L de la enzima *DNAsa I amplification grade* (Invitrogen) y 8  $\mu$ L del ARN (volumen final de 10  $\mu$ L). Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, se agregó a cada tubo 1  $\mu$ L de 25 mM EDTA y se incubó durante 10 minutos a 65 °C para inactivar a la enzima.

## 9.2. Transcripción reversa (RT)

Para la síntesis del ADN copia (ADNc), 9  $\mu$ L de los ARN extraídos y digeridos con DNAsa se incubaron con 2  $\mu$ L de *R6 random primers* (Biodynamics) a 80 °C durante 5 minutos y luego a 20 °C durante 3 minutos. Luego se adicionó la mezcla de reacción compuesta por: 6,25  $\mu$ L de *buffer* RT 5X, 200  $\mu$ M dNTPs, 1,25 mM  $Cl_2Mg$ , 10 mM DTT y 50 U/ $\mu$ L de transcriptasa reversa (MMLV-RT, Invitrogen), en un volumen final de 20  $\mu$ L y se incubó 1 hora 30 minutos a 37 °C.

## 9.3. Reacción en cadena de la polimerasa

El ADNc se utilizó como templado para amplificar el ARNm del gen X. La PCR se realizó colocando 10  $\mu$ L del ADNc a la mezcla de reacción compuesta por: 6,25  $\mu$ L de *buffer* 10X, 200  $\mu$ M dNTPs, 2 mM  $Cl_2Mg$ , 25 pmol de cada uno de los cebadores, 2,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y agua (volumen final de 50  $\mu$ L). La amplificación se realizó en un termociclador *PCR Sprint Thermal Cycler* (Thermo Electron Corporation) utilizando las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, 36 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C y 2 minutos a 72 °C y una extensión final de 10 minutos a 72 °C.



Nombre	Orientación	Secuencia 5' → 3'	Posición (nucleótidos)	Tm °C
HBV25	Sentido	TTGTGCTGCCAACTGGATC	1388-1407	52
HBV24	Antisentido	GGCAGAGGTGAAAAAGTTGC	1835-1816	52

**Tabla 3.** Cebadores utilizados en la amplificación del ARNm del gen X.

La visualización de los productos de amplificación (450 pb) se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en *buffer* TAE 1X, se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz UV.

#### 10. TINCIÓN CON AZUL TRIPÁN (colorante vital)

A las 48 horas post-transfección, el total de las células en placas de 24 pocillos se cosecharon (pegadas a la superficie de cultivo y en los sobrenadantes), se centrifugaron durante 10 minutos a 500 rpm, se resuspendieron en medio de crecimiento y se tiñeron con un igual volumen de una solución de 0,4 % de azul Tripán. Se incubaron con el colorante durante 3 minutos y se colocó una gota de la suspensión celular en una cámara de Neubauer. El recuento celular se realizó en un microscopio invertido Olympus CKX31 (*Olympus Corporation*) en los cuatro cuadrantes de la cámara. Se contó el número de células totales, células blancas (viables) y células azules (muertas). El número de células totales por mL y el porcentaje de mortalidad se calcularon según las siguientes fórmulas:

$$\underline{\text{N}^\circ \text{ de células/mL}} = \frac{\text{promedio células totales en 4 cuadrantes} \times \text{factor de dilución}}{10^4}$$

$$\underline{\% \text{ de mortalidad}} = \left( \frac{\text{promedio células azules en 4 cuadrantes}}{\text{promedio células totales en 4 cuadrantes}} \right) \times 100$$

## 11. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA CELULAR POR MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES

Los cambios característicos en la morfología celular inducidos por la expresión de HBV-X, se evaluaron a las 48 horas post-transfección mediante la observación bajo un microscopio de contraste de fases Olympus CKX31 (*Olympus Corporation*).

## 12. FRAGMENTACIÓN DEL ADN

El ADN celular se extrajo a las 48 horas post-transfección a partir de las células pegadas a la superficie de cultivo (tripsinizadas) y las desprendidas a los sobrenadantes.

Se utilizó el protocolo de fenol/cloroformo modificado de Powell y Gannon (2002). El total de las células (tripsinizadas y sobrenadantes) se centrifugaron a 500 rpm durante 10 minutos y se lavaron con 3 mL de PBS. El *pellet* celular se resuspendió en 600  $\mu$ L de *buffer* de digestión (50 mM Tris-HCl pH 8; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA pH 8; 0,5 % SDS), se agregó 3  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/mL, Sigma) y se incubó a 55 °C durante 3 horas. Se agregó un volumen de fenol (equilibrado en *buffer* TE pH 8, Sigma) y se agitó vigorosamente durante 10 segundos. Se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa superior, que contiene el ADN, a un nuevo tubo conteniendo igual volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó vigorosamente durante 10 segundos. Se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa superior a un nuevo tubo conteniendo 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5,5 y 2 volúmenes de etanol absoluto y se invirtió varias veces hasta observar la formación del ovillo de ADN. Se incubó durante 30 minutos a -80 °C y se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos a 4 °C. El *pellet* de ADN se lavó con 600  $\mu$ L de etanol 70 % (centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos) y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se secó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió en 30  $\mu$ L de *buffer* TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 1mM EDTA pH 8).

Los ADN purificados se mezclaron con *buffer* de carga 6X y se calentaron a 60 °C durante 10 minutos. El volumen total de las muestras se sembró en un gel de agarosa al 1 % y se corrió en *buffer* TAE 1X a un voltaje constante de 50 V durante 3 horas. Luego se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador de luz UV.

### 13. TINCIÓN CON NARANJA DE ACRIDINA Y BROMURO DE ETIDIO

La tinción con naranja de acridina ( $\lambda$  excitación: 510 nm,  $\lambda$  emisión: 595 nm) y bromuro de etidio ( $\lambda$  excitación: 502 nm,  $\lambda$  emisión: 526 nm) permite diferenciar células viables, células en apoptosis temprana y tardía, y células necróticas. El naranja de acridina penetra en células tanto viables como muertas y se intercala en el ADN doble cadena emitiendo fluorescencia verde y, también fluorescencia naranja, cuando se une a lisosomas o a ADN de simple cadena. El bromuro de etidio es un agente intercalante que emite fluorescencia roja-naranja en células con la membrana dañada en estados avanzados de apoptosis o necrosis. Por consiguiente, las células viables muestran núcleos verde brillante, las células apoptóticas tempranas presentan núcleos verde compacto difuso, las células apoptóticas tardías núcleos rojo-naranja compacto y las células necróticas poseen núcleos rojo-naranja difuso.

A las 48 horas post-transfección, el total de las células en placas de 24 pocillos se cosecharon, se centrifugaron durante 10 minutos a 500 rpm y se lavaron con 2 mL de PBS. Los *pellets* se resuspendieron en 200  $\mu$ L de una solución de 4  $\mu$ g/mL naranja de acridina (Sigma) y 4  $\mu$ g/mL bromuro de etidio (Sigma) en PBS. Las suspensiones celulares se colocaron en un portaobjetos y se observaron inmediatamente en un microscopio de fluorescencia (Leitz Dialux 20) y se fotografiaron. Para cada muestra se contaron al menos 300 células y se determinó el porcentaje de células viables, células apoptóticas tempranas, células apoptóticas tardías y células necróticas.

### 14. WESTERN BLOT

#### 14.1. Obtención de proteínas totales

La extracción de proteínas totales se realizó a partir del total de células a las 48 horas post-transfección. Las células del sobrenadante y las pegadas al soporte se cosecharon y se centrifugaron durante 10 minutos a 500 rpm. Se lavaron con 10 mL de PBS, el *pellet* se resuspendió en *buffer* de lisis [20 mM Tris; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 1 % Tritón; 1mM PMSF y cóctel inhibidor de proteasas (Sigma)], y las células se lisaron mediante 3 ciclos de congelado y descongelado. Se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos a 4 °C, se recuperaron los sobrenadantes, se alicuotaron y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

#### 14.2. Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (1976). Para cada cuantificación se realizó una curva de concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA; 1 a 10 mg/mL) sembrando 10  $\mu$ L de cada dilución por triplicado en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Para el caso de los extractos se agregaron 2  $\mu$ L de los mismos en 8  $\mu$ L de agua. Se agregó a cada pocillo 350  $\mu$ L del reactivo de Bradford (0,1 % *Coomassie Blue* G-250; 5 % etanol; 8,5 % ácido fosfórico) y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (Rayto). Se realizó la curva de absorbancia en función de la concentración de los estándares de albúmina, y se calcularon las concentraciones de proteínas en los extractos por interpolación en la curva de los valores de absorbancias.

#### 14.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

De 20-25  $\mu$ g de proteínas totales de los extractos se mezclaron con *buffer* de siembra 6X (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 1 % SDS; 30 % glicerol; 5 %  $\beta$ -mercaptoetanol; 0,012 % azul de bromofenol) hasta completar un volumen final de 20  $\mu$ L, y se calentaron a 100 °C durante 8 minutos. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida al 12-15 % (dependiendo de la proteína a analizar) y se corrieron a un voltaje constante de 200 V durante 60 minutos en *buffer* de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 0,1 % SDS), empleando el sistema *Mini-Protean Tetra Cell* (Bio-Rad). En cada gel se sembró un marcador de peso molecular para proteínas (*PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific*).

Finalizada la electroforesis, los geles se equilibraron en *buffer* de transferencia (25 mM Tris; 192 mM glicina; 15 % metanol; pH 8,3) para su posterior transferencia.

#### 14.4 Transferencia

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron desde los geles a membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno, Millipore), utilizando un equipo *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad). Previamente al armado del sándwich de transferencia, las membranas se activaron en metanol 100 % durante 15 segundos, se sumergieron en agua durante 2 minutos y se colocaron en el *buffer* de transferencia, hasta su uso. La transferencia se realizó durante 60 minutos a 100 V en frío. Se verificó la eficiencia del proceso mediante la tinción del gel transferido con *Coomasie Blue* (0,1 % *Coomasie Blue* R-250, 42 % metanol; 17 % ácido acético).

#### 14.5. Inmunodetección

Las membranas se bloquearon en solución de bloqueo [5 % leche en polvo descremada en T-TBS (0,1 % Tween20; 20 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,6)] durante una hora a temperatura ambiente en agitación y se lavaron con TBS (20 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,6). Se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en TBS o T-TBS, según corresponda, durante 16 horas a 4 °C. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con T-TBS en agitación de las membranas y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes, conjugados con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP), durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Se realizaron 2 lavados con T-TBS de 10 minutos y 2 lavados con TBS de 5 minutos cada uno. El revelado se realizó utilizando el reactivo de quimioluminiscencia ECL (*Enhanced chemoluminiscence*, Amersham GE Healthcare) y distintos tiempos de exposición de las placas (*Amersham Hyperfilm ECL*, Amersham GE Healthcare) sobre las membranas.

La intensidad de las bandas reveladas se cuantificó utilizando el programa *ImageJ* (Wayne Rasband, NIH, USA), y los valores correspondientes a cada una de las mismas se normalizaron en relación a los valores de  $\beta$ -actina (control de carga de proteínas totales, *housekeeping gene*) y los controles correspondientes a cada experimento.

Las diluciones de los anticuerpos utilizados en los distintos *Western Blots* fueron las siguientes: 1.- Anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal anti-Bcl-2 (dilución 1:250 en T-TBS, *Santa Cruz Biotechnology*), anticuerpo monoclonal anti-Bax (dilución 1:500 en TBS, *Santa Cruz Biotechnology*), anticuerpo policlonal anti-Bcl-XL (dilución 1:500 en TBS, *Santa Cruz Biotechnology*), anticuerpo policlonal anti-MAP LC3 $\beta$  (dilución 1:200 en TBS, *Santa Cruz Biotechnology*) y anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -actina (dilución 0,5  $\mu$ g/mL en TBS, Sigma). 2.- Anticuerpos secundarios: anticuerpo monoclonal anti-ratón (dilución 1:10000 en T-TBS para Bcl-2 y Bax, y dilución 1:30000 en T-TBS para  $\beta$ -actina, *Santa Cruz Biotechnology*), y anticuerpo policlonal anti-conejo (dilución 1:10000 en T-TBS para Bcl-X y LC3 $\beta$ , *Santa Cruz Biotechnology*), todos conjugados con HRP.

#### 14.6. Stripping de la membrana

Luego de ser inmunodetectadas, el despegado de los anticuerpos se realizó colocando las membranas en *buffer de stripping* (62,5 mM Tris-HCl pH 6,7; 2 % SDS; 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol) durante 30 minutos a 50 °C en agitación y lavando con T-TBS durante 10 minutos en agitación.

## 15. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Las células totales (sobrenadantes y pegadas al soporte) se fijaron a las 48 horas post-transfección para luego realizar los preparados y los cortes finos y ultrafinos a ser observados. Para ello, se recolectó el medio de cultivo, se lavó la monocapa 2 veces con PBS, y las células se fijaron con 2 % glutaraldehído en *buffer* fosfato (80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4) durante 2 horas a 4 °C. Se levantó la monocapa utilizando una espátula y la totalidad de la suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 500 rpm. Se removió la solución de fijado y se realizaron 3 lavados con *buffer* fosfato cada 20 minutos a 4 °C. Se realizó una segunda fijación con 1 % tetróxido de osmio en *buffer* fosfato y se lavó con agua destilada. Se incubaron con 2 % acetato de uranilo durante toda la noche y se deshidrataron con una serie de gradientes de etanol seguido de óxido de propileno. Luego, las células se embebieron en la resina epoxi *Araldite* (*Huntsman Advanced Materials*). Sobre los tacos obtenidos se realizaron cortes semifinos de 1 µm de grosor, se tiñeron con azul de toluidina y se observaron al microscopio óptico para seleccionar las zonas de interés. Posteriormente, se realizaron los cortes ultrafinos, que fueron montados en grillas de cobre y teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las grillas conteniendo las secciones se observaron en un microscopio electrónico de transmisión *Jeol JEM 1200EX II* (Servicio Central de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata) y se fotografiaron (ES500W Erlangshen CCD Gatan).

## 16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se realizaron por triplicado de manera independiente. La significación estadística se determinó mediante la prueba de *t* de *Student*. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró como estadísticamente significativo. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desvío estándar.

# RESULTADOS



## RESULTADOS

### 1. CLONADO DEL GEN X

El clonado del gen X se realizó a partir de muestras de suero de pacientes con infección crónica por HBV. Se seleccionaron muestras disponibles en el Laboratorio en base a los aminoácidos presentes en las posiciones aminoacídicas 130-131 de la HBV-X salvaje (KV) y mutada (MI). Las mismas habían sido previamente genotipificadas por secuenciación y pertenecían a los subgenotipos F1b y F4.

Se amplificó por PCR el gen X con cebadores específicos y el producto se clonó en el vector pGEM-T y luego se re-clonó en el vector de expresión en células de mamíferos pcDNA3.0. Se secuenció el gen X de los clones positivos para verificar la correcta orientación del mismo y las secuencias nucleotídicas correspondientes a las formas salvaje y mutada de HBV-X. La figura 13 muestra la secuencia de aminoácidos de HBV-X de los clones seleccionados para los experimentos.

```

F1b_KV 1  MAARLCCQLD PTRDVLCLRP VGEASSGRSL SGS LGAVSPP SPSAVPADDG SHLSLRGLFV CSFSSAGPCA LRFTSARRME TTVNAPRSLP TVLHKRTLGL 100
F1b_MI 1  MAARLCCQLD PTRDVLCLRP VGEASSGRSL SGS LGAVSPP SPSAVPADDG SHLSLRGLFV CSFSSAGPCA LRFTSARRME TTVNAPRSLP TVLHKRTLGL 100
F4_KV 1  MAARLCCQLD PARDVLCLRP VGEASRGRPL PGPLGGLPPS SPSAVPANDG SHLSLRGLFV CAFSPAGPCA LRFTSARRME TTVNAHWSLP TVLHKRTLGL 100
F4_MI 1  MAARLCCQLD PARDVLCLRP VGEASRGRPL PGPLGGLPPS SASAVPADHG SHLSLRGLFV CSFSSAGPCA LRFTSARRME TTVNAFWSLP TVLYKRTIGL 100

F1b_KV 101 SGRSITWIEE YIKDCVFKDW EELGEEIRLK VFVLGGCRHK LVCSPAPCNF FTSA 154
F1b_MI 101 SGRSITWIEE YIKDCVFKDW EELGEEIRLM IFVLGGCRHK LVCSPAPCNF FTSA 154
F4_KV 101 SGRSMTWIEE YIKDCVFKDW EELGEEIRLK VFVLGGCRHK LVCSPAPFNF FTSA 154
F4_MI 101 SGRSMTWIEE YIKDCVFKDW EELGEEIRLM IYVLGGCRHK LVCSPAPCNF FTSA 154

```

**Figura 13.** Secuencia de aminoácidos de HBV-X salvaje (KV) y mutada (MI) de los subgenotipos F1b y F4 de los clones seleccionados. La región sombreada muestra los aminoácidos presentes en las posiciones 130 y 131 de las proteínas.

### 2. EXPRESIÓN DE HBV-X EN CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO

La expresión transiente de HBV-X de los subgenotipos F1b y F4 con distintos aminoácidos en 130-131 se realizó en tres líneas celulares de hepatoma humano: HepG2, Hep3B y Huh-7.



## **2.1. Optimización de la transfección**

La puesta a punto de la transfección se realizó empleando diferentes concentraciones de ADN (0,1 y 0,2 µg de plásmido de expresión), de reactivo de transfección (relaciones lípido de transfección:ADN de 1:1 y 2:1) y distintos tiempos de incubación post-transfección (24 y 48 horas).

Para los posteriores experimentos la concentración de ADN seleccionada fue de 0,1 µg y la relación del lípido de transfección:ADN fue de 2:1 para las líneas HepG2 y Huh-7 y de 1:1 para la línea Hep3B. El tiempo de incubación post-transfección seleccionado fue de 48 horas, debido a que varios autores han descrito que a ese tiempo se obtiene la máxima expresión de HBV-X (Clippinger et al., 2009; Lizzano et al., 2011).

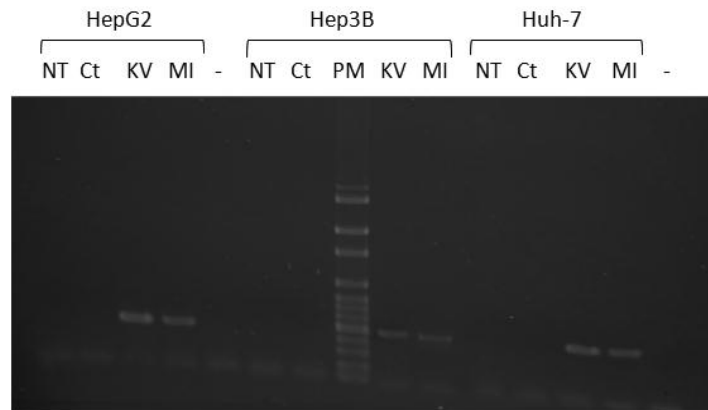
## **2.2. Detección del ARNm del gen X mediante RT-PCR**

Para determinar si las tres líneas de hepatoma transfectadas expresaban las formas salvaje y mutada de HBV-X de los subgenotipos F1b y F4, 48 horas luego de la transfección se amplificó el ARNm del gen X por RT-PCR.

### **2.2.a. Subgenotipo F1b**

Se detectó el ARNm del gen X en las tres líneas celulares transfectadas con HBV-X salvaje (KV) y mutada (MI) del subgenotipo F1b (Figura 14). Por el contrario, en las células no transfectadas (NT), en las células transfectadas con el plásmido control (Ct) sin inserto, así como en el control negativo (-) no se detectó la banda de 450 pb correspondiente al ARNm de la HBV-X (Figura 14).

Estos resultados confirman que como consecuencia de la transfección hay transcripción del mRNA del gen X salvaje y mutado del subgenotipo F1b en las tres líneas celulares analizadas.

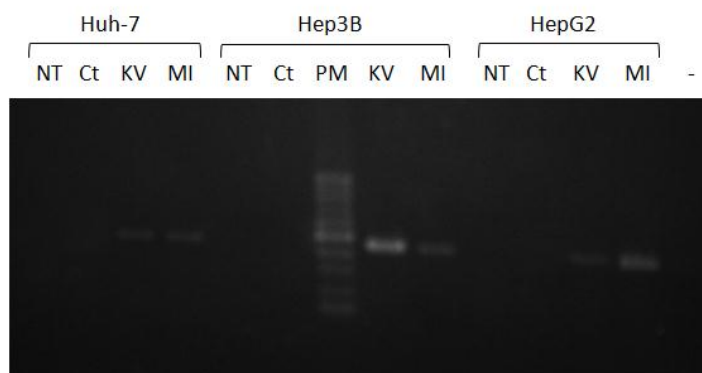


**Figura 14.** Detección del ARNm de HBV-X en células no transfectadas (NT), transfectadas con plásmido control (Ct), HBV-X salvaje (KV) y HBV-X mutada (MI) del subgenotipo F1b, mediante RT-PCR. (-): control negativo; PM: marcador de peso molecular (100 pb).

#### 2.2.b. Subgenotipo F4

Se detectó el ARNm del gen X en las tres líneas celulares transfectadas con HBV-X salvaje (KV) y mutada (MI) del subgenotipo F4 (Figura 15). Por el contrario, en las células no transfectadas (NT), en las células transfectadas con el plásmido control (Ct), así como en el control negativo (-) no se detectó la banda de 450 pb correspondiente al ARNm de la HBV-X (Figura 15).

Estos resultados confirman que como consecuencia de la transfección hay transcripción del mRNA del gen X salvaje y mutado del subgenotipo F4 en las tres líneas celulares analizadas.



**Figura 15.** Detección del ARNm de HBV-X en células no transfectadas (NT), transfectadas con plásmido control (Ct), HBV-X salvaje (KV) y HBV-X mutada (MI) del subgenotipo F4, mediante RT-PCR. (-): control negativo; PM: marcador de peso molecular (100 pb).

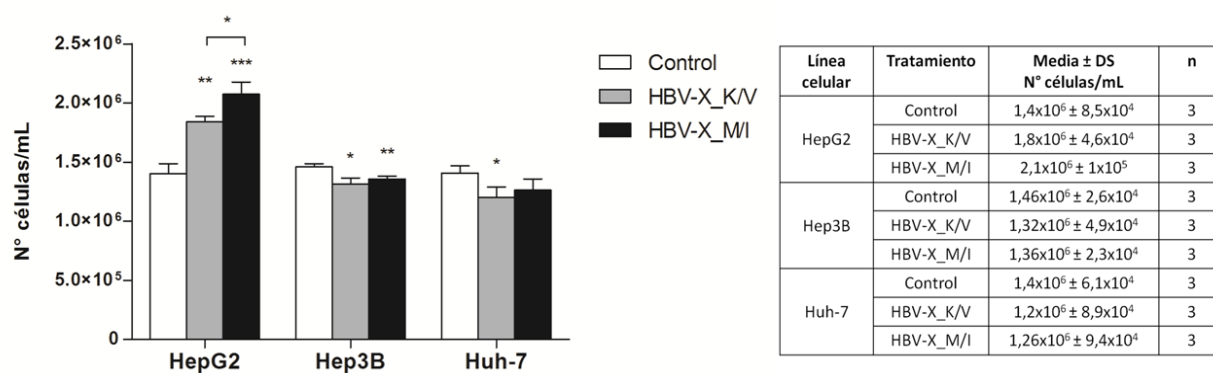
### 3. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR

Para estudiar el efecto de la expresión de las distintas formas de la proteína sobre la viabilidad celular, se analizó el número de células totales (viables y no viables) y el porcentaje de mortalidad de las células transfectadas con ambas variantes de la HBV-X, mediante la tinción con el colorante vital azul tripán.

#### 3.1. Subgenotipo F1b

El recuento de células viables y no viables en las células transfectadas con el plásmido control y los constructos F1b se muestra en la figura 16 y tabla 4. En las HepG2, se observaron aumentos significativos del 29 % y del 50 % en el número de células totales en las transfectadas con las formas salvaje y mutada de HBV-X respectivamente, en relación al control. Además, este aumento fue un 17 % significativamente mayor en las células que expresaban HBV-X\_M/I, en relación a las que expresaban la forma salvaje. En las Hep3B, el número total de células disminuyó de manera significativa un 10 % en las que expresaban HBV-X\_K/V y un 7 % en las que expresaban HBV-X\_M/I, con respecto a las células control sin expresión de la proteína. En las Huh-7, se detectó una disminución significativa del 14 % en las transfectadas con la proteína salvaje y una disminución del 10 % en las transfectadas con HBV-X\_M/I. En estas últimas dos líneas no se observaron diferencias significativas en la cantidad de células totales en aquellas que expresaban ambas formas de HBV-X.

Estos resultados muestran que la expresión de ambas formas de HBV-X del subgenotipo F1b produce un incremento de la cantidad de células HepG2, resultando este aumento mayor en las transfectadas con HBV-X\_M/I, respecto de las que expresaban HBV-X\_K/V. Además, se observa una disminución en el número total de células Hep3B y Huh-7, como consecuencia de la expresión de ambas formas de HBV-X.

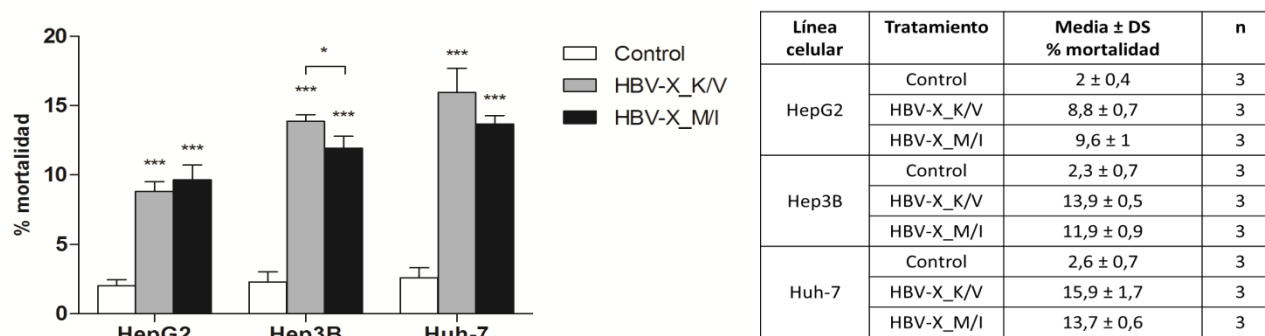


**Figura 16 y tabla 4.** Recuento de células totales (viables y no viables) transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F1b. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$  y \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Al analizar el efecto de la expresión de ambas formas de HBV-X sobre la mortalidad celular, las tres líneas celulares utilizadas mostraron aumentos significativos en el porcentaje de células muertas, en relación a las células control. Los resultados se resumen en la tabla 5 y se grafican en la figura 17.

En las HepG2, el porcentaje de células muertas aumentó un 340 % en aquellas que expresaban HBV-X\_K/V y un 380 % en las que expresaban HBV-X\_M/I, comparadas con las células control. En las Hep3B, se observaron aumentos del 504 % y del 417 % en el porcentaje de células muertas en las transfectadas con las formas salvaje y mutada de la proteína respectivamente, en comparación con las células control. Por último, en las Huh-7 el aumento del porcentaje de células muertas fue de un 512 % para las células que expresaban HBV-X\_K/V y de un 427 % para las células que expresaban HBV-X\_M/I, en relación con el control.

Al analizar comparativamente los efectos inducidos por la expresión de ambas formas de la proteína para cada línea celular, se observó que en las Hep3B el porcentaje de células muertas fue un 17 % significativamente superior en las que expresaban HBV-X\_K/V en relación a las que expresaban la forma mutada del subgenotipo F1b. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de muerte inducidos por la expresión de las HBV-X salvaje y mutada sobre las HepG2 ni sobre las Huh-7.

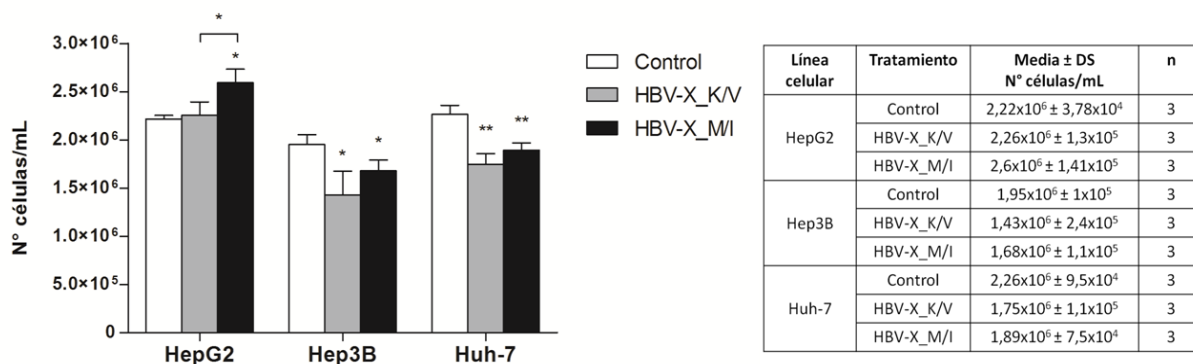


**Figura 17 y tabla 5.** Mortalidad de células transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F1b. \*  $p < 0,05$  y \*\*\*  $p < 0,0001$ .

En resumen, la expresión de HBV-X salvaje y mutada del subgenotipo F1b disminuyó el número de células totales (viables y no viables) y aumentó el porcentaje de células muertas en las líneas Hep3B y Huh-7. En la línea HepG2 la expresión de las proteínas aumentó significativamente tanto el número de células totales como el porcentaje de células muertas.

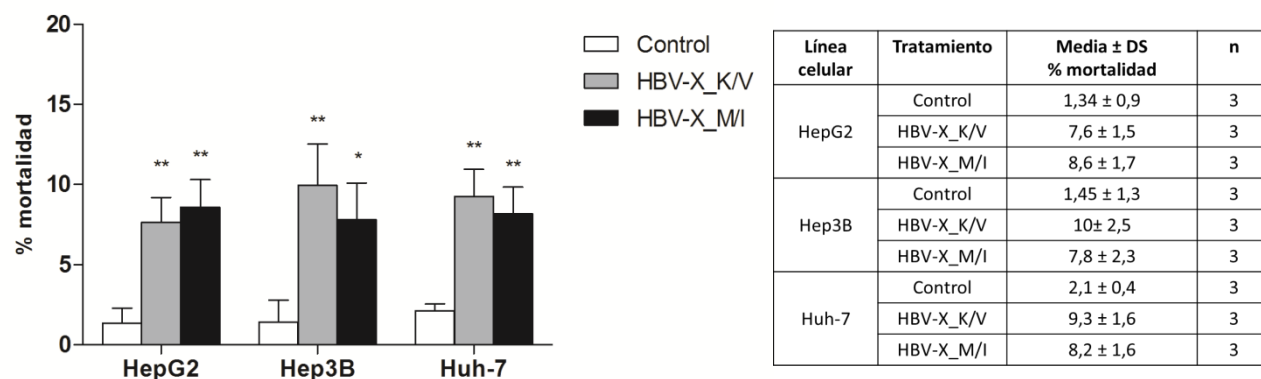
### 3.2. Subgenotipo F4

En las células transfectadas con las dos formas de HBV-X del subgenotipo F4, se detectó un aumento en la cantidad de células totales (viables y no viables) en las HepG2. Los aumentos fueron del 2 % en las transfectadas con la forma salvaje y del 18 % en las transfectadas con la forma mutada, en relación al control. Este aumento resultó un 15 % mayor en las células transfectadas con HBV-X\_M/I, respecto de las transfectadas con HBV-X\_K/V. En las Hep3B, se observó una disminución del 26 % en la cantidad de células totales en aquellas que expresaban la forma salvaje de HBV-X, y del 14 % en las que expresaban la forma mutada, respecto al control. En las Huh-7, el porcentaje de células totales disminuyó un 23 % en las que expresaban HBV-X\_K/V y un 16 % en las que expresaban HBV-X\_M/I. No se observaron diferencias significativas del análisis comparativo de la cantidad de células totales que resultaban por el efecto de ambas formas de HBV-X en las Hep3B ni en las Huh-7. Los resultados se muestran en la figura 18 y en la tabla 6.



**Figura 18 y tabla 6.** Recuento de células totales (viables y no viables) transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F4. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,005$ .

La mortalidad aumentó significativamente en las células que expresaban HBV-X salvaje y mutada del subgenotipo F4 (Figura 19 y tabla 7). En las HepG2, el aumento de células muertas fue del 467 % para las que expresaban HBV-X\_K/V y del 542 % para las que expresaban HBV-X\_M/I, en relación al control. En las Hep3B, el incremento de células muertas fue del 590 % en las que expresaban HBV-X\_K/V y un 438 % en las que expresaban HBV-X\_M/I, comparados con las células control. Las Huh-7 mostraron aumentos del 343 % y del 290 % en las células muertas en las transfectadas con las formas salvaje y mutada de la proteína respectivamente y en comparación con los controles. Al analizar comparativamente los efectos producidos sobre la mortalidad entre ambas formas de HBV-X, no se detectaron diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad para ninguna de las tres líneas celulares estudiadas.

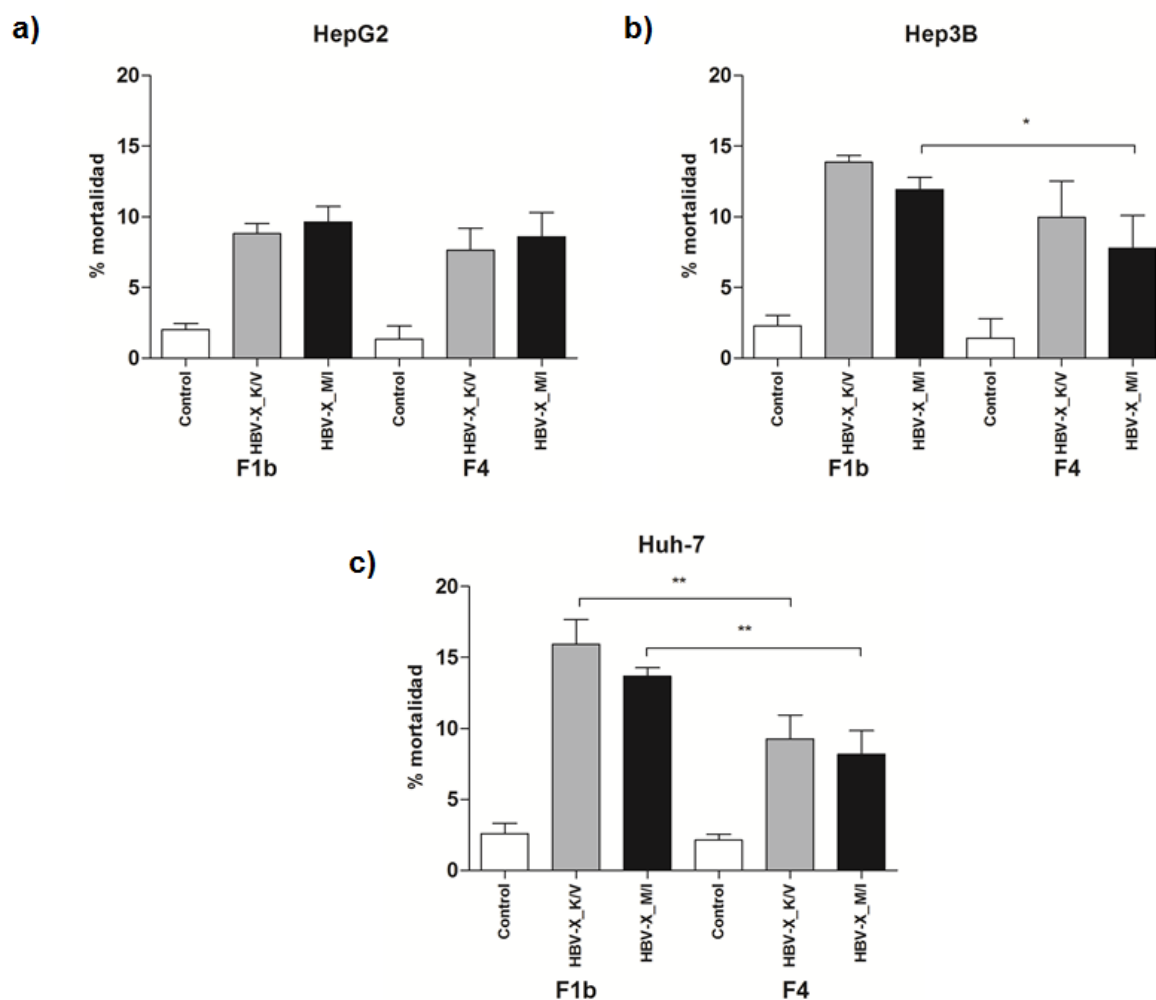


**Figura 19 y tabla 7.** Mortalidad de células transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F4. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,005$ .

En resumen, y en concordancia a lo observado para el subgenotipo F1b, la expresión de las formas (salvaje y mutada) de HBV-X del subgenotipo F4 disminuyó el número de células totales y aumentó la mortalidad en las Hep3B y Huh-7. En las HepG2, la expresión de ambas proteínas condujo tanto al aumento del número de células totales como al aumento de células muertas.

### 3.3. Comparación del porcentaje de mortalidad en los subgenotipos F1b y F4

La comparación entre la mortalidad obtenida en las células transfectadas con ambos subgenotipos de HBV-X para cada línea celular se resume en la figura 20.



**Figura 20.** Comparación de la mortalidad de células transfectadas con ambas formas de HBV-X de los subgenotipos F1b y F4, en HepG2 (a), Hep3B (b) y Huh-7 (c). \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,005$ .

En las HepG2 no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de células muertas en las transfectadas con ambos subgenotipos (Figura 20, a). En las Hep3B, el porcentaje de células muertas fue un 53 % mayor en las células que expresaban la proteína mutada del subgenotipo F1b, respecto del subgenotipo F4 (Figura 20, b). En las Huh-7, el porcentaje de mortalidad fue un 71 % y un 67 % superior en las transfectadas con HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F1b respectivamente, en relación a las células que expresaban ambas formas de la proteína del subgenotipo F4 (Figura 20, c).

En resumen, los resultados muestran que excepto para la línea HepG2, la mortalidad inducida por HBV-X fue mayor en las células que expresaban ambas formas de



la proteína del subgenotipo F1b, en comparación a ambas formas del F4.

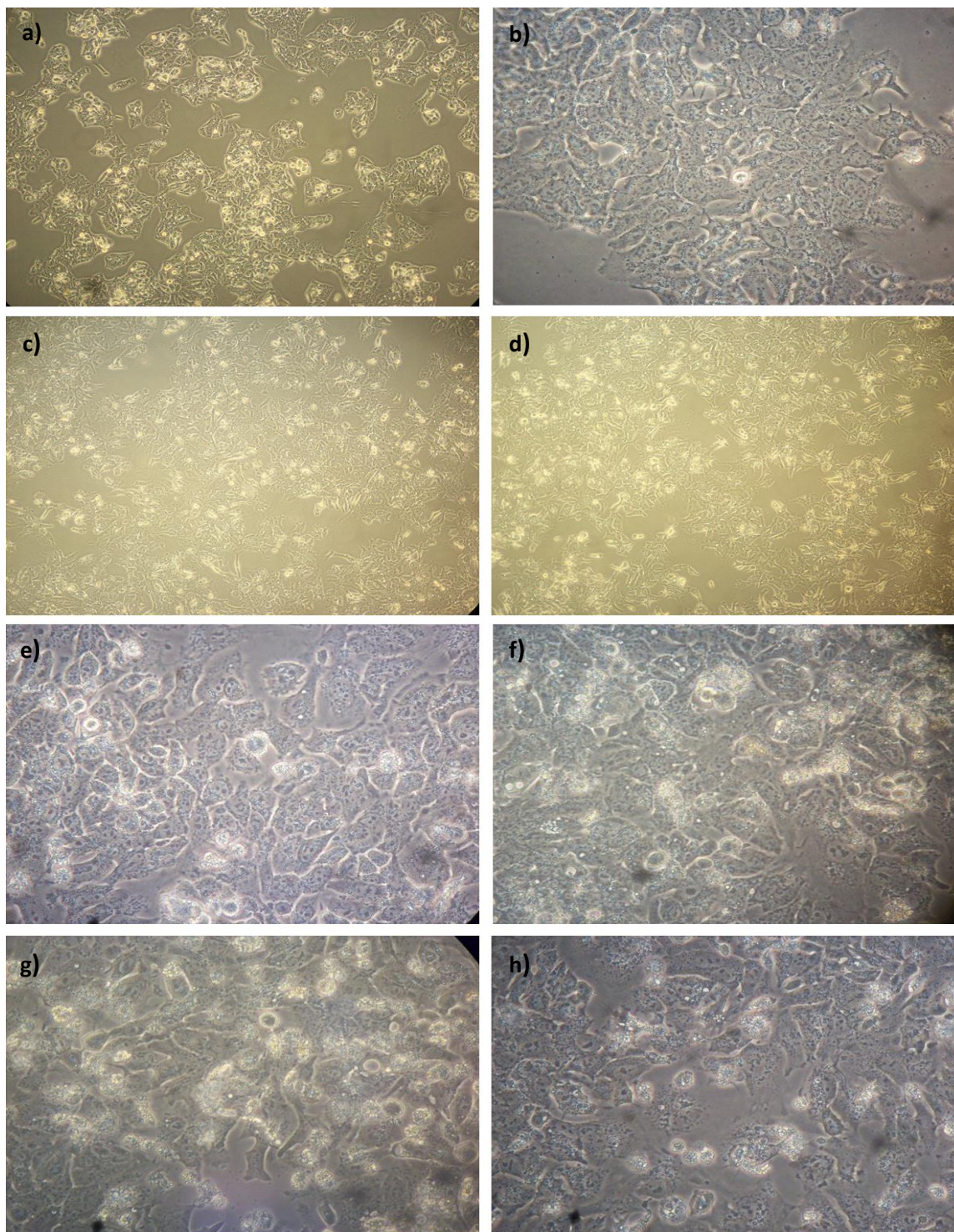
#### **4. INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS**

Para determinar si la muerte celular observada como consecuencia de la expresión de HBV-X se debía al proceso de apoptosis, se estudió la inducción de la misma por diferentes métodos (visualización de alteraciones morfológicas típicas por microscopía de contraste de fases, fragmentación del ADN y tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio).

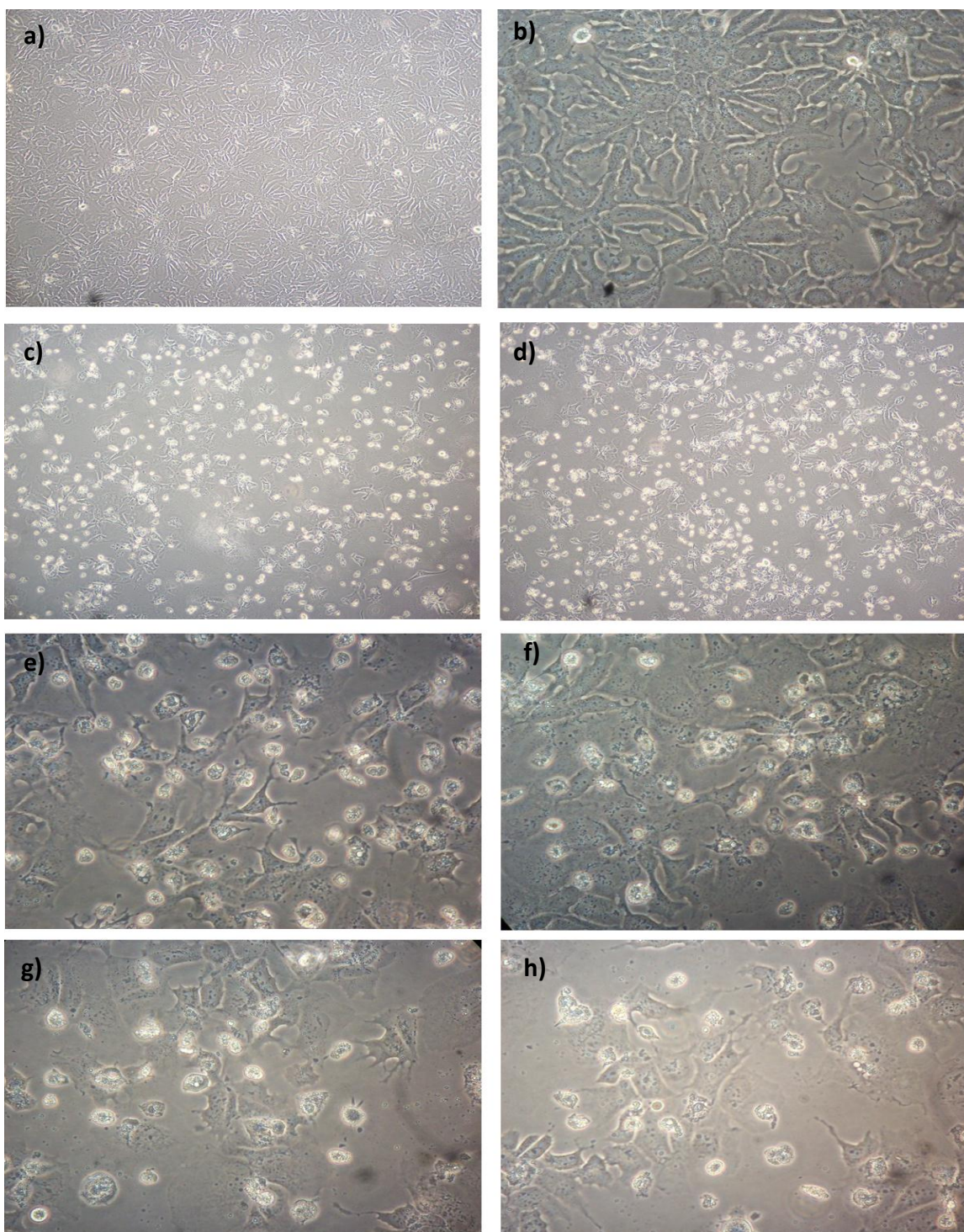
##### **4.1. Subgenotipo F1b**

###### **4.1.a. Alteraciones morfológicas por microscopía de contraste de fases**

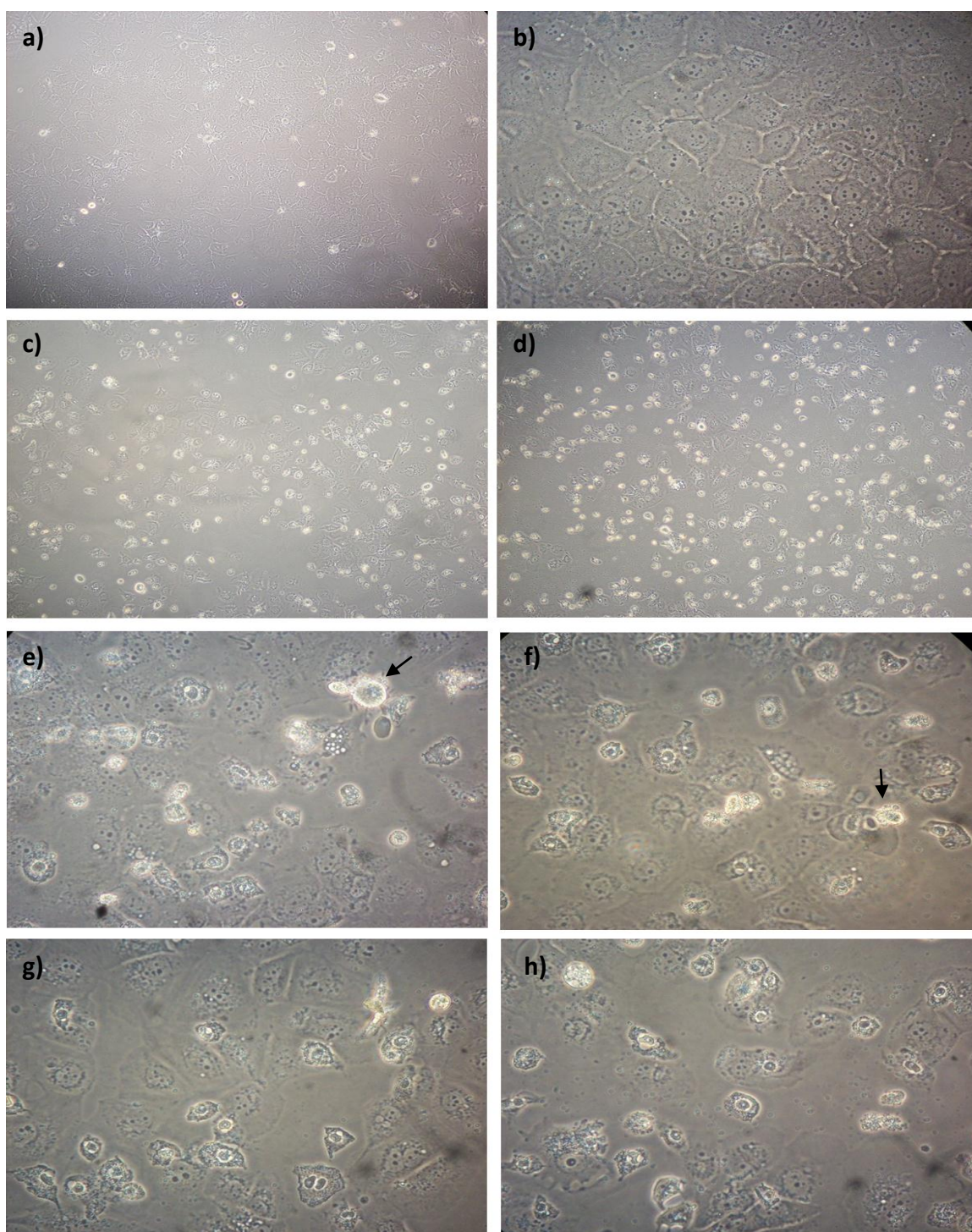
Los cambios morfológicos que experimentaron las tres líneas celulares que expresaban ambas formas de HBV-X se evidenciaron al comparar la morfología de las mismas con la de las células control. Los controles presentaban la morfología típica de cada línea celular, con alguna célula en división, con ausencia de células muertas y/o despegadas de la superficie de cultivo (Figuras 21-23, a y b). Por el contrario, las células que expresaban tanto la forma salvaje (Figuras 21-23, c, e y g) como la forma mutada (Figuras 21-23, d, f y h) de HBV-X, presentaron las típicas alteraciones morfológicas características de la muerte por apoptosis, como redondeamiento, disminución de tamaño, pérdida del contacto con otras células, despegado de la superficie de cultivo y aumento de la refringencia. También se observó la condensación y marginación de la cromatina sobre la membrana nuclear, la formación de pequeñas protuberancias en el citoplasma o “*blebbing*” (flechas negras) y de cuerpos apoptóticos. Cabe aclarar que en el caso de las HepG2, en las células transfectadas con ambas formas de HBV-X, se observó un doble efecto, una mayor confluencia o crecimiento de las monocapas comparadas con el control, y además alteraciones típicas de la apoptosis (Figura 21).



**Figura 21.** Morfología al microscopio de contraste de fases de HepG2 control (**a** magnificación 100X y **b** magnificación 400X), transfectadas con HBV-X\_K/V (**c** magnificación 100X y **e-g** magnificación 400X) y HBV-X\_M/I del subgenotipo F1b (**d** magnificación 100X y **f-h** magnificación 400X).



**Figura 22.** Morfología al microscopio de contraste de fases de Hep3B control (**a** magnificación 100X y **b** magnificación 400X), transfectadas con HBV-X\_K/V (**c** magnificación 100X y **e-g** magnificación 400X) y HBV-X\_M/I del subgenotipo F1b (**d** magnificación 100X y **f-h** magnificación 400X).

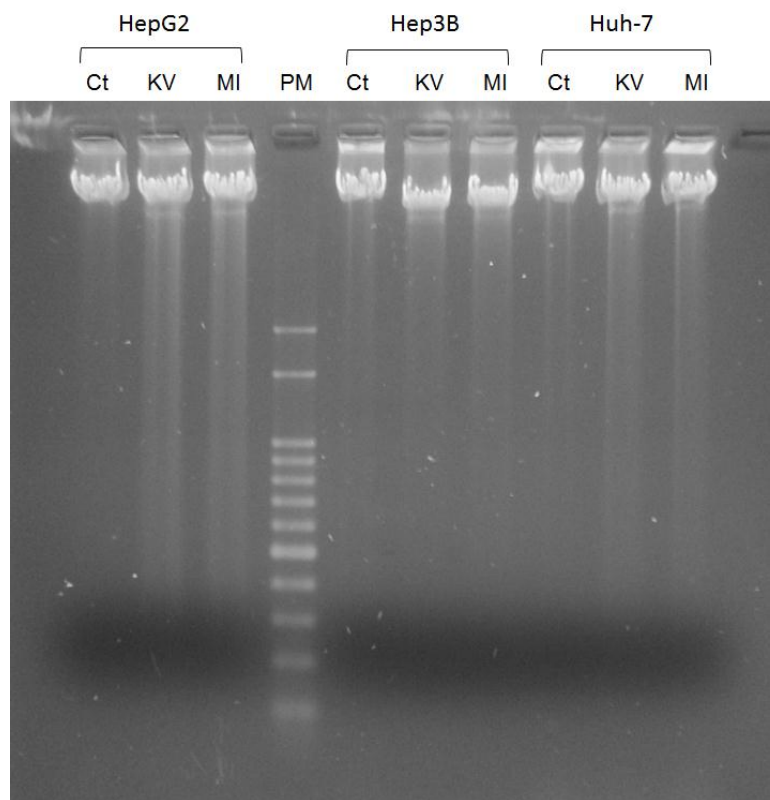


**Figura 23.** Morfología al microscopio de contraste de fases de Huh-7 control (**a** magnificación 100X y **b** magnificación 400X), transfectadas con HBV-X\_K/V (**c** magnificación 100X y **e-g** magnificación 400X) y HBV-X\_M/I del subgenotipo F1b (**d** magnificación 100X y **f-h** magnificación 400X). Fechas negras: células apoptóticas con “*blebbing*”.

#### 4.1.b. Fragmentación del ADN

Una característica del proceso apoptótico es la degradación del ADN celular en fragmentos múltiples de 200 pb, que generan un patrón de escalera o “*laddering*” en la electroforesis en gel de agarosa. Este característico patrón de degradación es específico de la apoptosis y es una herramienta de gran utilidad para identificar este tipo de muerte celular.

Como se observa en la figura 24, la expresión de HBV-X\_K/V y HBV-XM/I del subgenotipo F1b indujo la fragmentación del ADN celular en las tres líneas celulares estudiadas. En los controles de cada línea se observó el ADN sin degradar, y en las células que expresaban ambas formas de HBV-X, se detectó el ADN degradado en fragmentos múltiples de 200 pb. Al analizar comparativamente los efectos de HBV-X\_K/V y HBV-X\_MI sobre las células, no se observaron diferencias en la intensidad de degradación del ADN, en ninguna de las tres líneas celulares analizadas.

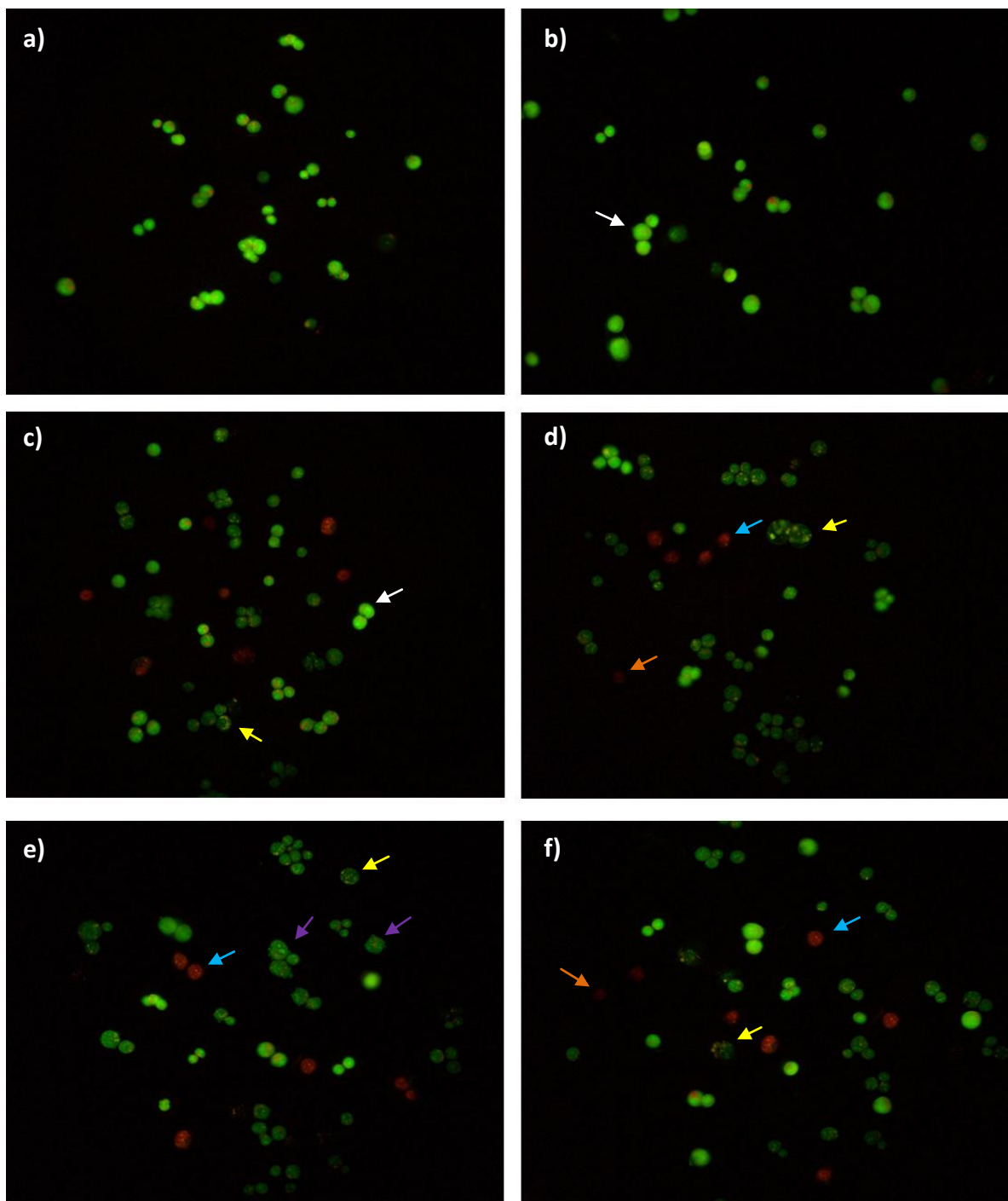


**Figura 24.** Fragmentación del ADN de células transfectadas con plásmido control (Ct), HBV-X salvaje (KV) y mutada (MI) del subgenotipo F1b. PM: marcador de peso molecular (100 pb).

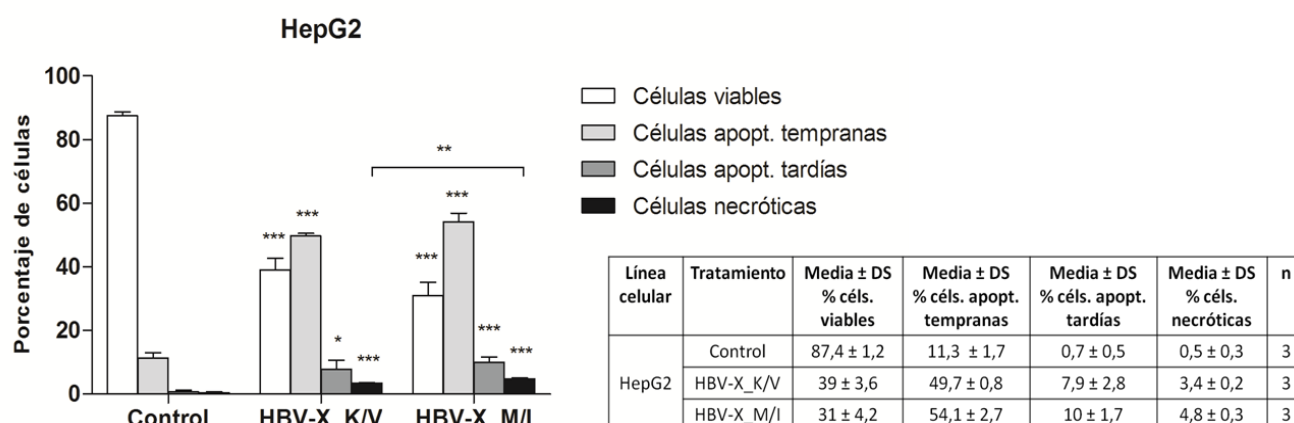
#### 4.1.c. Tinción con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio

La tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio permite diferenciar entre células viables (núcleos verde brillante), células en apoptosis temprana (núcleos verde compacto difuso), células en apoptosis tardía (núcleos rojo-naranja compacto) y células necróticas (núcleos rojo-naranja difuso). Las células transfectadas con ambas formas de HBV-X se tiñeron, se observaron por microscopía de fluorescencia y se determinaron los distintos porcentajes para cada línea celular.

En las HepG2 (Figura 26 y tabla 8), se observó una disminución significativa del 55 % y del 65 % de células viables (Figura 25, flechas blancas) en las que expresaban las HBV-X salvaje y mutada, respectivamente y en comparación con las células control. En cambio, el porcentaje de células en apoptosis temprana (Figura 25, flechas amarillas) y tardía (Figura 25, flechas celestes) y de células necróticas (Figura 25, flechas naranjas) aumentó de manera significativa en las células transfectadas con HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I, respecto de las células control. El aumento de células en apoptosis temprana en relación al control fue del 340 % para las que expresaban HBV-X salvaje y del 379 % para las que expresaban HBV-X mutada. En las células en apoptosis tardía el aumento fue del 1029 % para la forma salvaje y del 1329 % para la forma mutada. Las células necróticas aumentaron un 580 % y un 860 % en las transfectadas con HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I, respectivamente y en relación al control. La comparación entre ambas formas de la HBV-X reveló diferencias significativas únicamente en la cantidad de células necróticas (41 % de aumento de células necróticas en las que expresaban HBV-X\_M/I, en relación a las que expresaban HBV-X\_K/V). En la figura 25 pueden observarse células apoptóticas con el característico “*blebbing*” (flechas violetas).



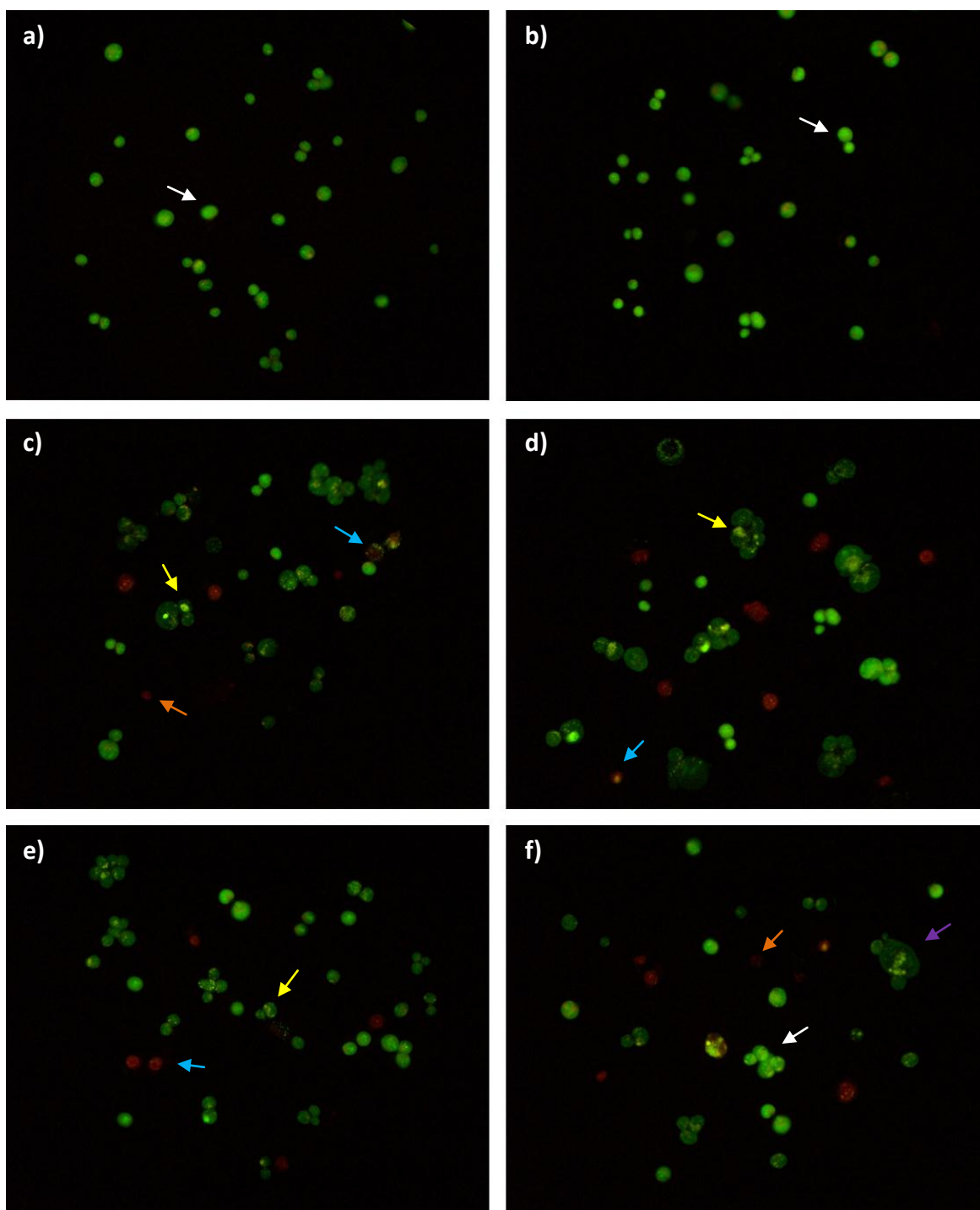
**Figura 25.** Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio de HepG2 control (**a-b**, 250X), transfectadas con HBV-X salvaje (**c-d**, 250X) y HBV-X mutada (**e-f**, 250X) del subgenotipo F1b. Flechas blancas: células viables; flechas amarillas: células en apoptosis temprana; flechas celestes: células en apoptosis tardía; flechas naranjas: células necróticas; flechas violetas: células apoptóticas con “*blebbing*”.



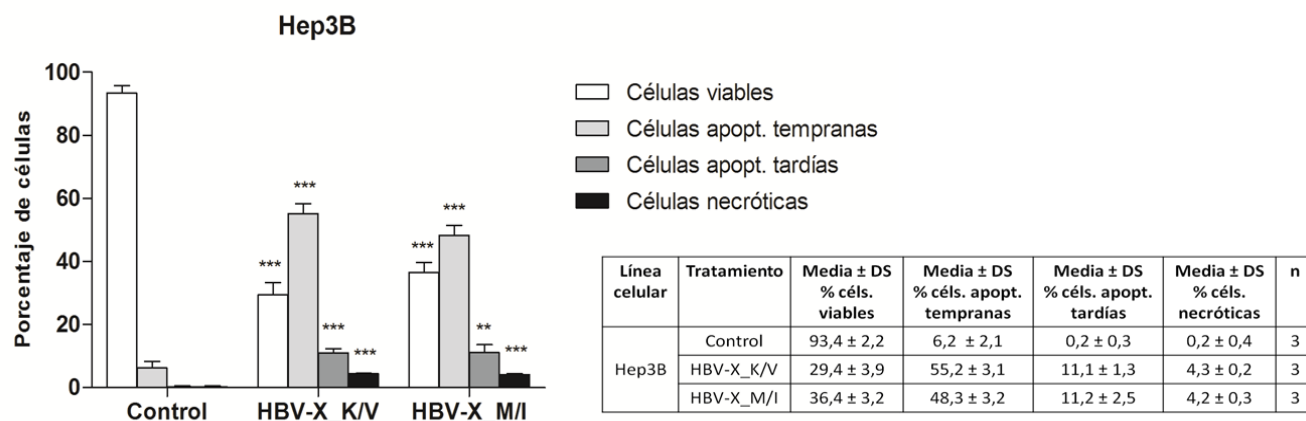
**Figura 26 y tabla 8.** Porcentaje de células viables, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas de HepG2 transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F1b. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$  y \*\*\*  $p < 0,0001$ .

En las Hep3B (Figura 27-28 y tabla 9), el número de células viables (Figura 27, flechas blancas) disminuyó un 69 % en las que expresaban la forma salvaje de HBV-X y un 61 % en las que expresaban la forma mutada, en relación al control. Las células en apoptosis temprana (Figura 27, flechas amarillas) aumentaron un 790 % y un 679 % para HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I, respectivamente. El aumento de las células en apoptosis tardía (Figura 27, flechas celestes) fue del 5450 % para las transfectadas con HBV-X salvaje y del 5500 % para las transfectadas con HBV-X mutada. Las células necróticas (Figura 27, flechas naranjas) mostraron aumentos del 2050 % y del 2000 % en las que expresaban la proteína salvaje y mutada, comparadas con las células control. No se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de los distintos grupos de células al analizar comparativamente la consecuencia de la expresión de ambas formas de HBV-X. La figura 27 muestra, una célula apoptótica con el característico “*blebbing*” (flecha violeta).



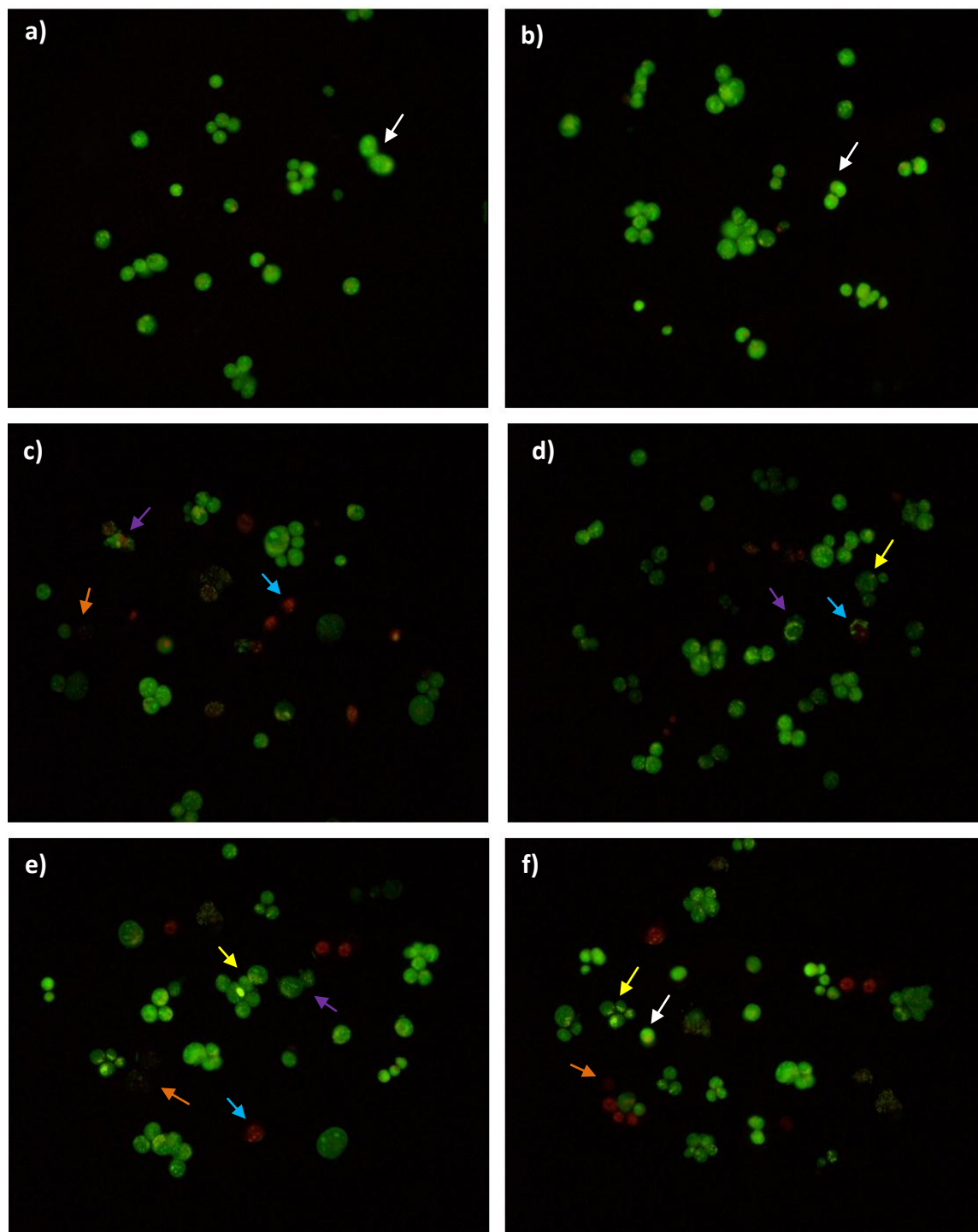


**Figura 27.** Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio de Hep3B control (**a-b**, 250X), transfectadas con HBV-X salvaje (**c-d**, 250X) y HBV-X mutada (**e-f**, 250X) del subgenotipo F1b. Flechas blancas: células viables; flechas amarillas: células en apoptosis temprana; flechas celestes: células en apoptosis tardía; flechas naranjas: células necróticas; flechas violetas: células apoptóticas con “*blebbing*”.

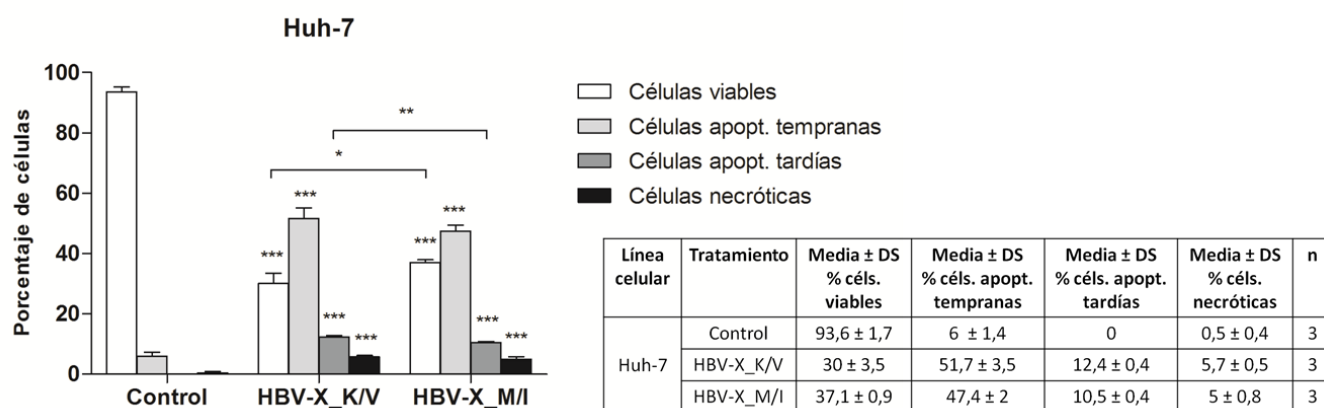


**Figura 28 y tabla 9.** Porcentaje de células viables, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas de Hep3B transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F1b. \*\*  $p < 0,005$  y \*\*\*  $p < 0,0001$ .

En las Huh-7 (Figura 29-30 y tabla 10), también se observó una disminución significativa en el porcentaje de células viables (68 % y 60 % en las que expresaban las formas salvaje y mutada respecto al control; figura 29, flechas blancas) y un aumento significativo en el porcentaje de células en apoptosis temprana (762 % y 690 % para las transfectadas con HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I respectivamente; figura 29, flechas amarillas) y tardía (Figura 29, flechas naranjas) y de células necróticas (1040 % y 900 % en las que expresaban HBV-X salvaje y mutada en relación al control; figura 29, flechas celestes). El análisis comparativo entre los porcentajes inducidos por la expresión de HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I reveló diferencias significativas en las células viables y en las células apoptóticas tardías: 19 % menos de células viables y 18 % más de células apoptóticas tardías en las células transfectadas con HBV-X\_K/V respecto a HBV-X\_M/I. En la figura 29 también pueden observarse numerosas células apoptóticas con “blebbing” (flechas violetas).



**Figura 29.** Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio de Huh-7 control (**a-b**, 250X), transfectadas con HBV-X salvaje (**c-d**, 250X) y HBV-X mutada (**e-f**, 250X) del subgenotipo F1b. Flechas blancas: células viables; flechas amarillas: células en apoptosis temprana; flechas celestes: células en apoptosis tardía; flechas naranjas: células necróticas; flechas violetas: células apoptóticas con “*blebbing*”.



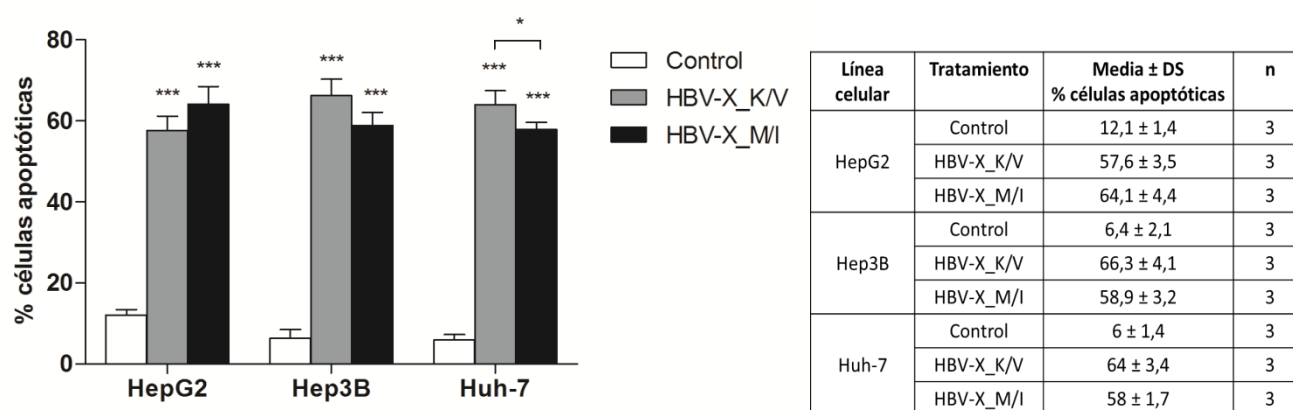
**Figura 30 y tabla 10.** Porcentaje de células viables, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas de la línea Huh-7 transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F1b. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$  y \*\*\*  $p < 0,0001$ .

En resumen, los resultados muestran que en las tres líneas celulares analizadas, la expresión de las formas salvaje y mutada de HBV-X del subgenotipo F1b disminuye significativamente el porcentaje de células viables y aumenta significativamente el porcentaje de células en apoptosis temprana y tardía, y de células necróticas.

Además, se analizó diferencialmente el porcentaje de células en apoptosis temprana y tardía en las tres líneas celulares que expresaban ambas HBV-X. Los resultados se resumen en la tabla 11 y se grafican en la figura 31.

En las tres líneas celulares estudiadas, el porcentaje de células en apoptosis fue significativamente mayor en las células transfectadas con ambas HBV-X, en relación a las células control. Las HepG2 mostraron aumentos del 376 % y del 430 % en las transfectadas con HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I, respectivamente en comparación a los controles. En la línea Hep3B el porcentaje de células en apoptosis aumentó un 936 % en las que expresaban HBV-X salvaje y un 820 % en las que expresaban la HBV-X mutada, en relación al control. Las Huh-7 mostraron un aumento del 967 % en las que expresaban HBV-X salvaje y del 867 % en las que expresaban HBV-X mutada, respecto al control. La comparación de las células que expresaban HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I reveló que en las Huh-7, el porcentaje de células en apoptosis fue un 10 % significativamente mayor en las transfectadas con la proteína salvaje, en comparación a las transfectadas con la forma

mutada. Adicionalmente, se observaron mayores porcentajes (no significativos) de células apoptóticas en las HepG2 que expresaban HBV-X\_M/I y en las Hep3B que expresaban HBV-X\_K/V.



**Figura 31 y tabla 11.** Porcentaje de células en apoptosis temprana y tardía transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F1b. \*  $p < 0,05$  y \*\*\*  $p < 0,0001$ .

En resumen, los resultados presentados demuestran que la expresión transiente de las formas salvaje y mutada de la HBV-X del subgenotipo F1b induce la apoptosis en las tres líneas celulares de hepatoma analizadas.

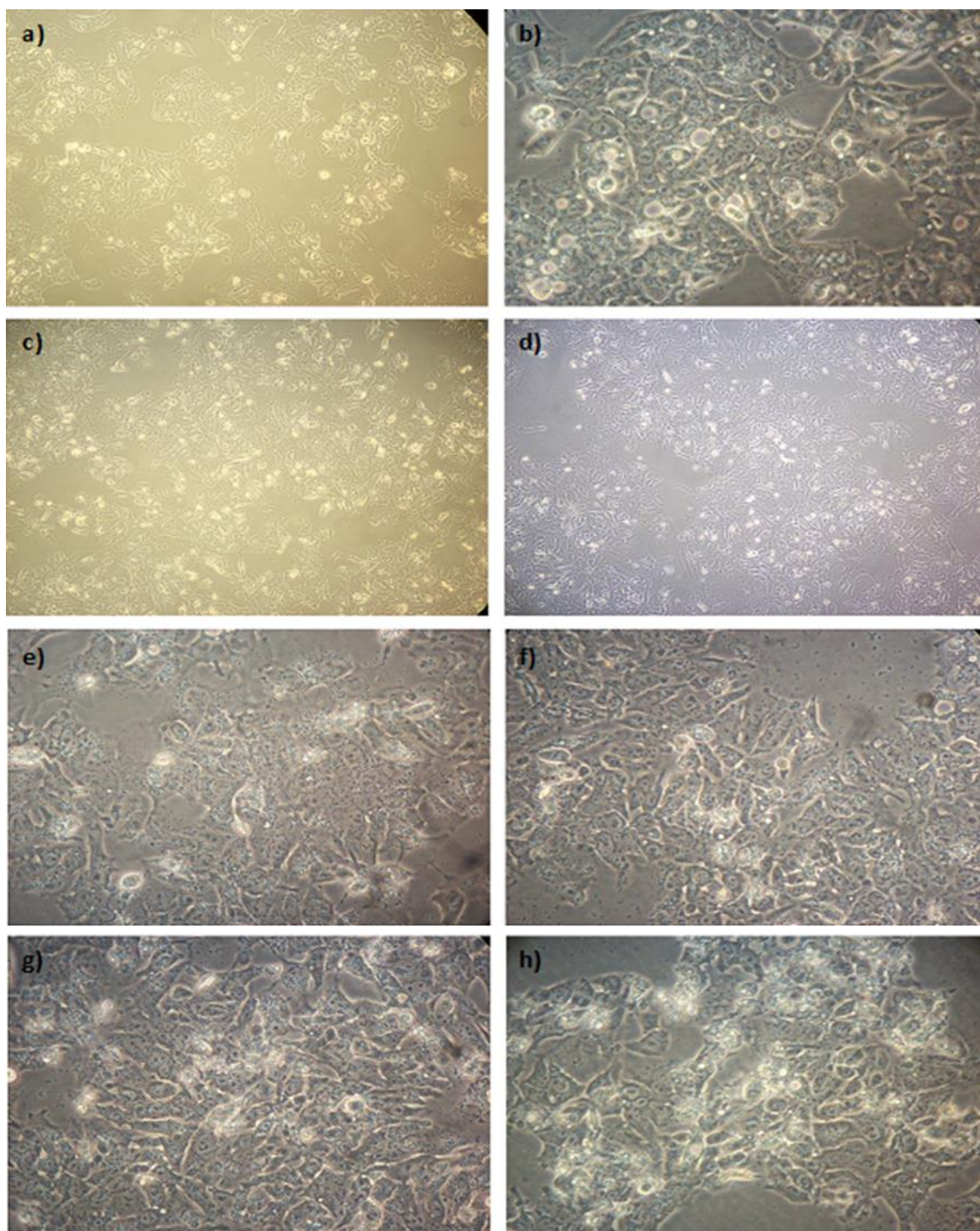
## 4.2. Subgenotipo F4

### 4.2.a. Alteraciones morfológicas por microscopía de contraste de fases

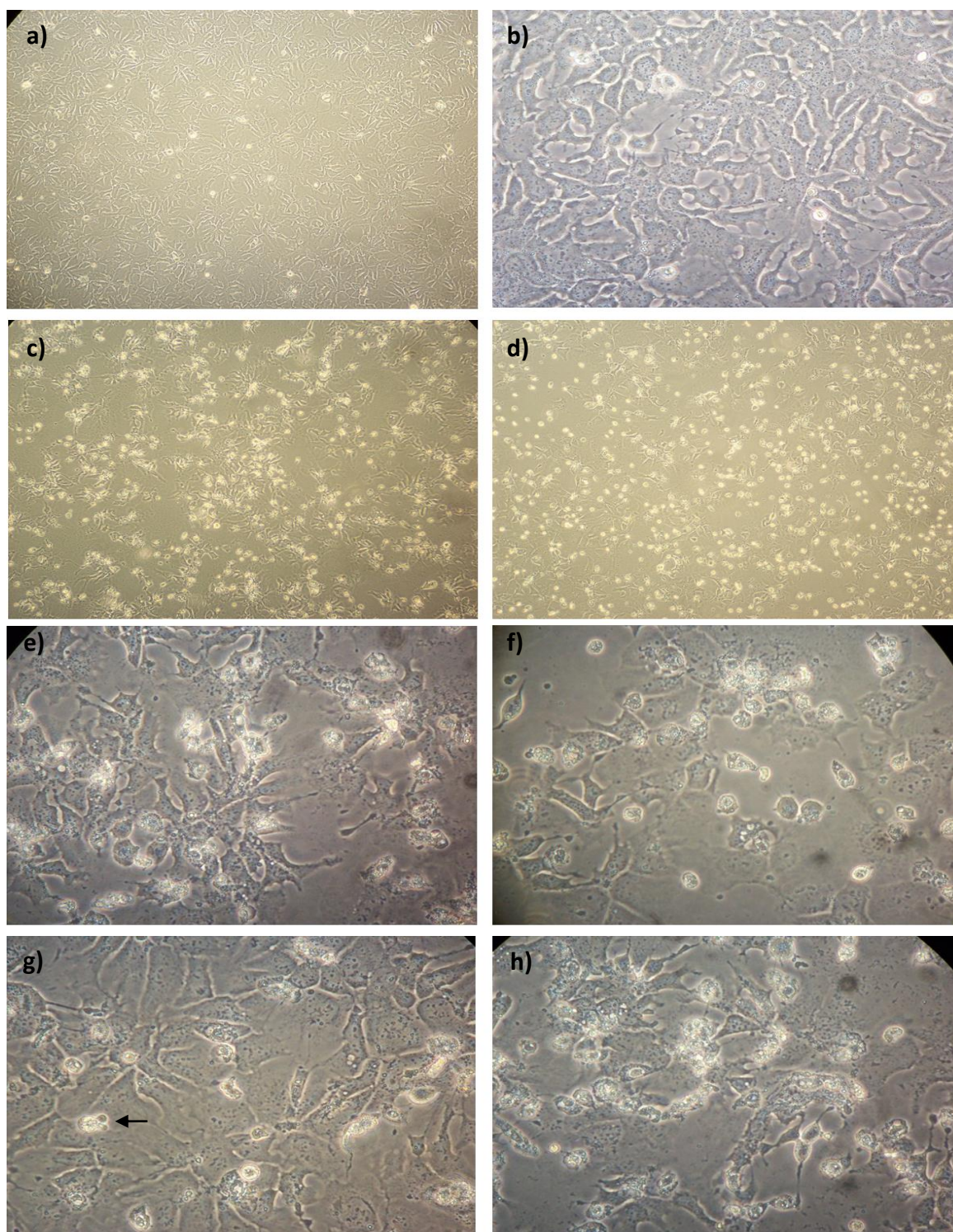
La observación de las células en el microscopio de contraste de fases mostró resultados similares a los obtenidos con el subgenotipo F1b. Los controles (Figuras 32-34, a y b) formaban monocapas confluentes de células, con ausencia de células muertas. Por el contrario, la expresión de HBV-X\_K/V (Figuras 32-34, c, e y g) y de HBV-X\_M/I (Figuras 32-34 d, f y h) produjo alteraciones morfológicas típicas de la muerte por apoptosis. Resultó evidente la pérdida de contacto entre las células, la disminución del tamaño celular, el redondeamiento, la condensación y marginación de la cromatina, el “*blebbing*”

(flechas negras), la formación de vacuolas y de cuerpos apoptóticos y el desprendimiento de las células del soporte de cultivo.

De manera similar a lo observado para el subgenotipo F1b, en la línea celular HepG2, la expresión de ambas HBV-X mostró no sólo células con una morfología típica de la muerte por apoptosis, sino que además produjo un mayor crecimiento celular, evidenciado por la mayor confluencia de las monocapas (Figura 32).

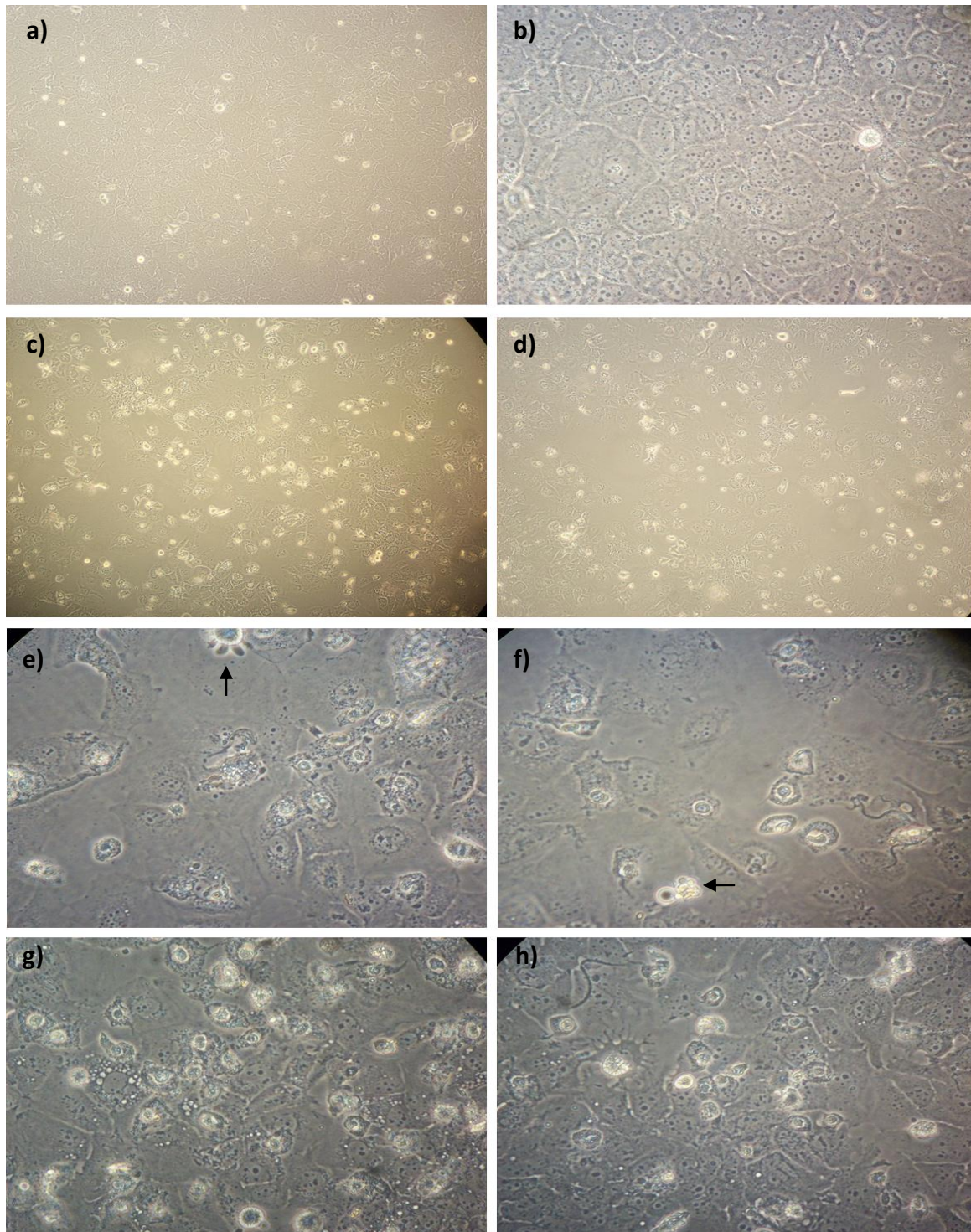


**Figura 32.** Morfología al microscopio de contraste de fases de HepG2 control (**a** magnificación 100X y **b** magnificación 400X), transfectadas con HBV-X\_K/V (**c** magnificación 100X y **e-g** magnificación 400X) y HBV-X\_M/I del subgenotipo F4 (**d** magnificación 100X y **f-h** magnificación 400X).



**Figura 33.** Morfología al microscopio de contraste de fases de Hep3B control (**a** magnificación 100X y **b** magnificación 400X), transfectadas con HBV-X\_K/V (**c** magnificación 100X y **e-g** magnificación 400X) y HBV-X\_M/I del subgenotipo F4 (**d** magnificación 100X y **f-h** magnificación 400X). Fechas negras: células apoptóticas con “*blebbing*”.

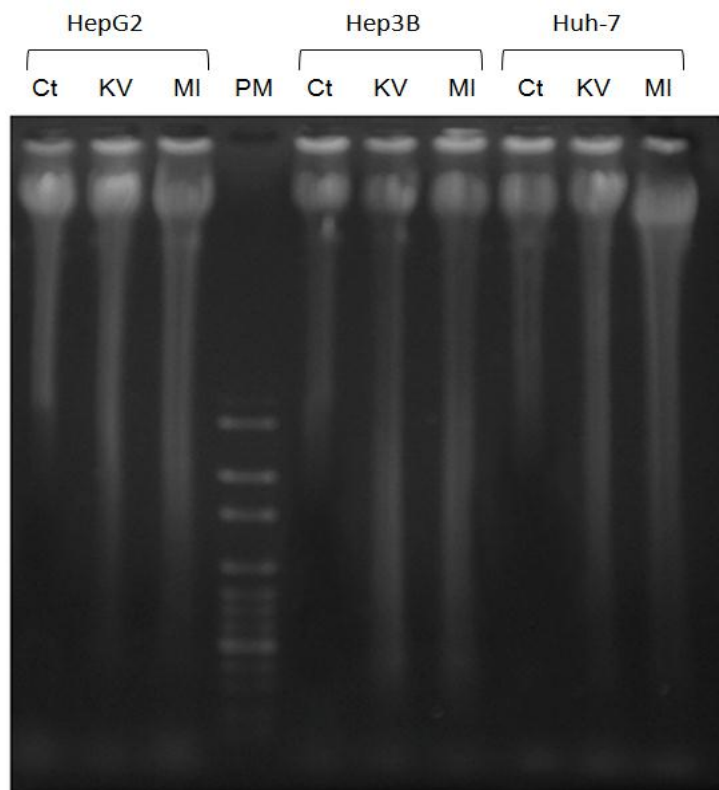




**Figura 34.** Morfología al microscopio de contraste de fases de Huh-7 control (**a** magnificación 100X y **b** magnificación 400X), transfectadas con HBV-X\_K/V (**c** magnificación 100X y **e-g** magnificación 400X) y HBV-X\_M/I del subgenotipo F4 (**d** magnificación 100X y **f-h** magnificación 400X). Fechas negras: células apoptóticas con “*blebbing*”.

#### 4.2.b. Fragmentación del ADN

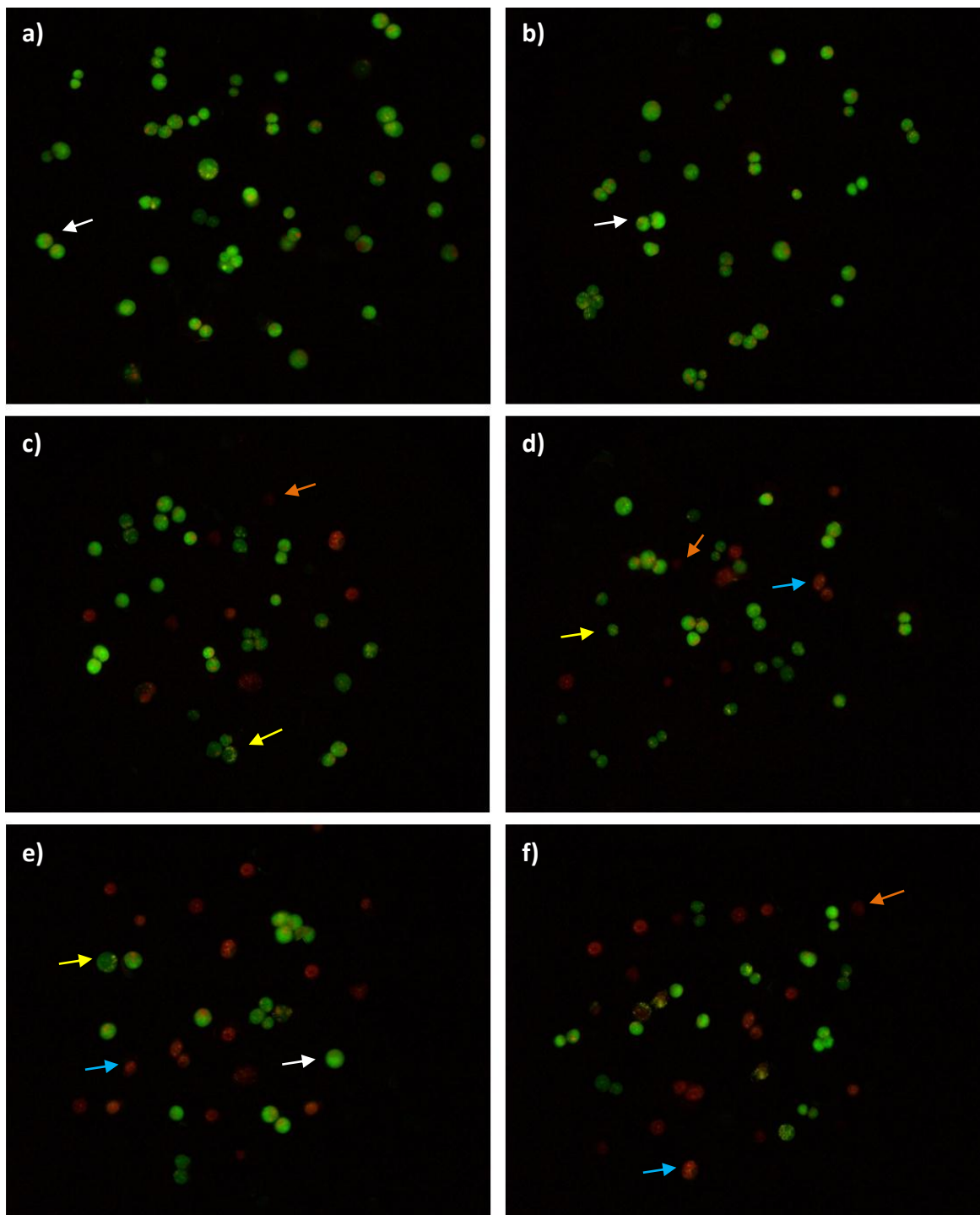
El análisis de la degradación del ADN genómico de las células transfectadas con ambas HBV-X del subgenotipo F4 se muestra en la figura 35. En coincidencia con lo observado para el subgenotipo F1b, la expresión de HBV-X\_K/V y HBV-X\_MI indujo la fragmentación del ADN en múltiplos de 200 pb en las tres líneas celulares, a diferencia de las células control, en las cuales el ADN permaneció intacto sin degradar. La comparación en la intensidad del patrón de fragmentos (*ladder*) generado por ambas formas de HBV-X, no mostró diferencias en las tres líneas estudiadas.



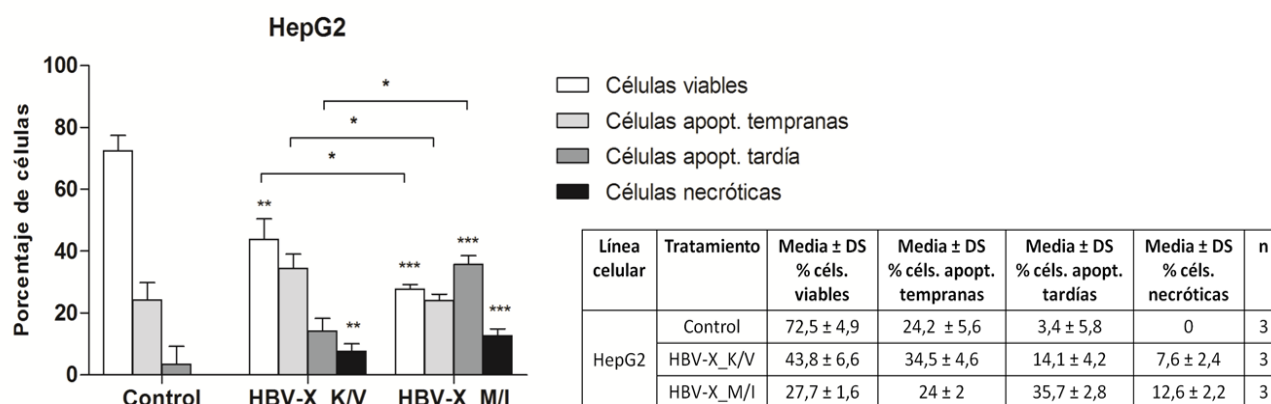
**Figura 35.** Fragmentación del ADN de células transfectadas con plásmido control (Ct), HBV-X salvaje (KV) y HBV-X mutada (MI) del subgenotipo F4. PM: marcador de peso molecular (100 pb).

#### **4.2.c. Tinción con Naranja de acridina y Bromuro de Etidio**

En la figura 36 se muestran células HepG2 transfectadas y teñidas. Los resultados se grafican en la figura 37 y se resumen en la tabla 12. Como se evidencia tanto en las fotos como en las gráficas, se observó una disminución significativa en el porcentaje de células viables (40 % y 62 % de disminución en las células transfectadas con HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I, respectivamente y respecto al control) y un aumento significativo en la cantidad de células necróticas y en apoptosis tardía (950 % de aumento en las que expresaban HBV-X mutada, en relación al control). La comparación entre las actividades de las dos formas de HBV-X reveló diferencias significativas en la cantidad de células viables (disminución del 37 % en las transfectadas con HBV-X\_M/I, respecto de las transfectadas con HBV-X\_K/V), de células en apoptosis temprana (aumento del 44 % en las que expresaban la forma salvaje en relación a las que expresaban la proteína mutada) y de células en apoptosis tardía (aumento del 153 % en las transfectadas con HBV-X mutada respecto de las que expresaban HBV-X salvaje).

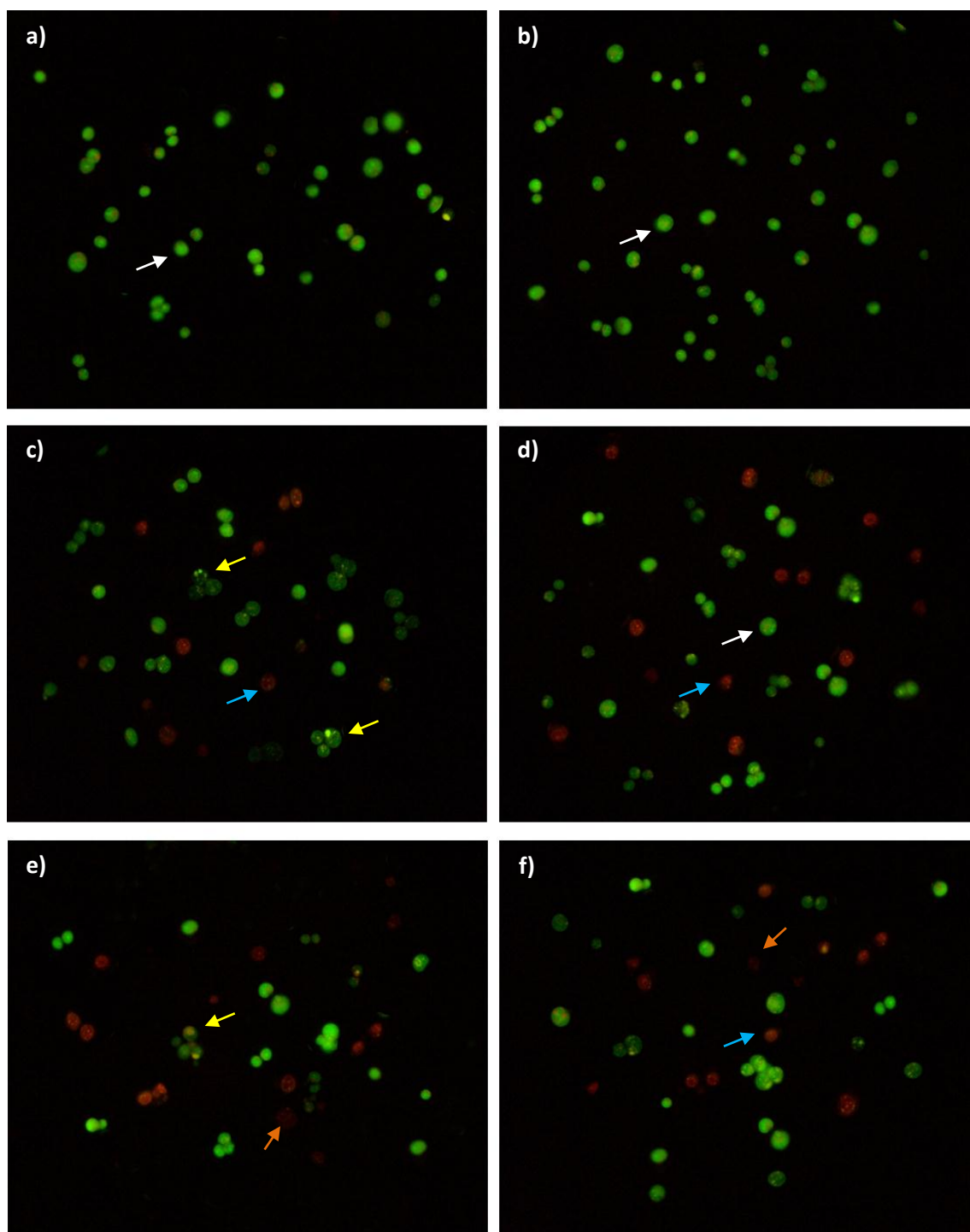


**Figura 36.** Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio de HepG2 control (**a-b**, 250X), transfectadas con HBV-X salvaje (**c-d**, 250X) y HBV-X mutada (**e-f**, 250X) del subgenotipo F4. Flechas blancas: células viables; flechas amarillas: células en apoptosis temprana; flechas celestes: células en apoptosis tardía; flechas naranjas: células necróticas.

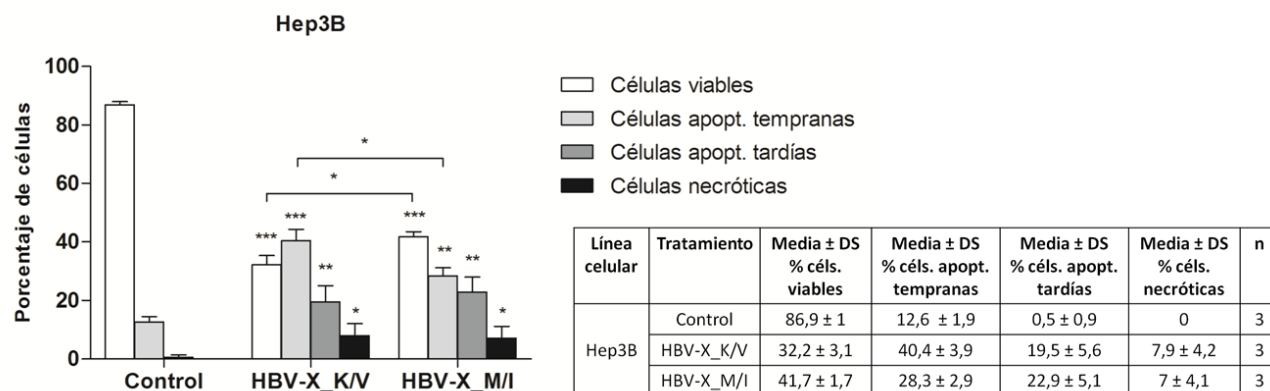


**Figura 37 y tabla 12.** Porcentaje de células viables, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas de HepG2 transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F4. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$  y \*\*\*  $p < 0,0001$ .

En las Hep3B (Figuras 38-39 y tabla 13), el porcentaje de células viables (Figura 38, flechas blancas) disminuyó un 63 % en las que expresaban HBV-X\_K/V y un 52 % en las que expresaban HBV-X\_M/I, en relación al control. Además, se evidenciaron aumentos significativos en el porcentaje de células en apoptosis temprana (221 % de aumento para las que expresaban la forma salvaje y 125 % para las que expresaban la forma mutada; figura 38, flechas amarillas), de células en apoptosis tardía (3800 % de aumento para HBV-X\_K/V y 4480 % de aumento para HBV-X\_M/I; figura 38, flechas celestes) y de células necróticas (Figura 38, flechas naranjas), que expresaban ambas HBV-X, en relación a las células control. La comparación de los porcentajes inducidos por ambas formas de HBV-X mostró una disminución del 23 % en las células viables y un aumento significativo del 44 % en las células en apoptosis temprana que expresaban HBV-X\_K/V, respecto de las que expresaban a HBV-X\_M/I.

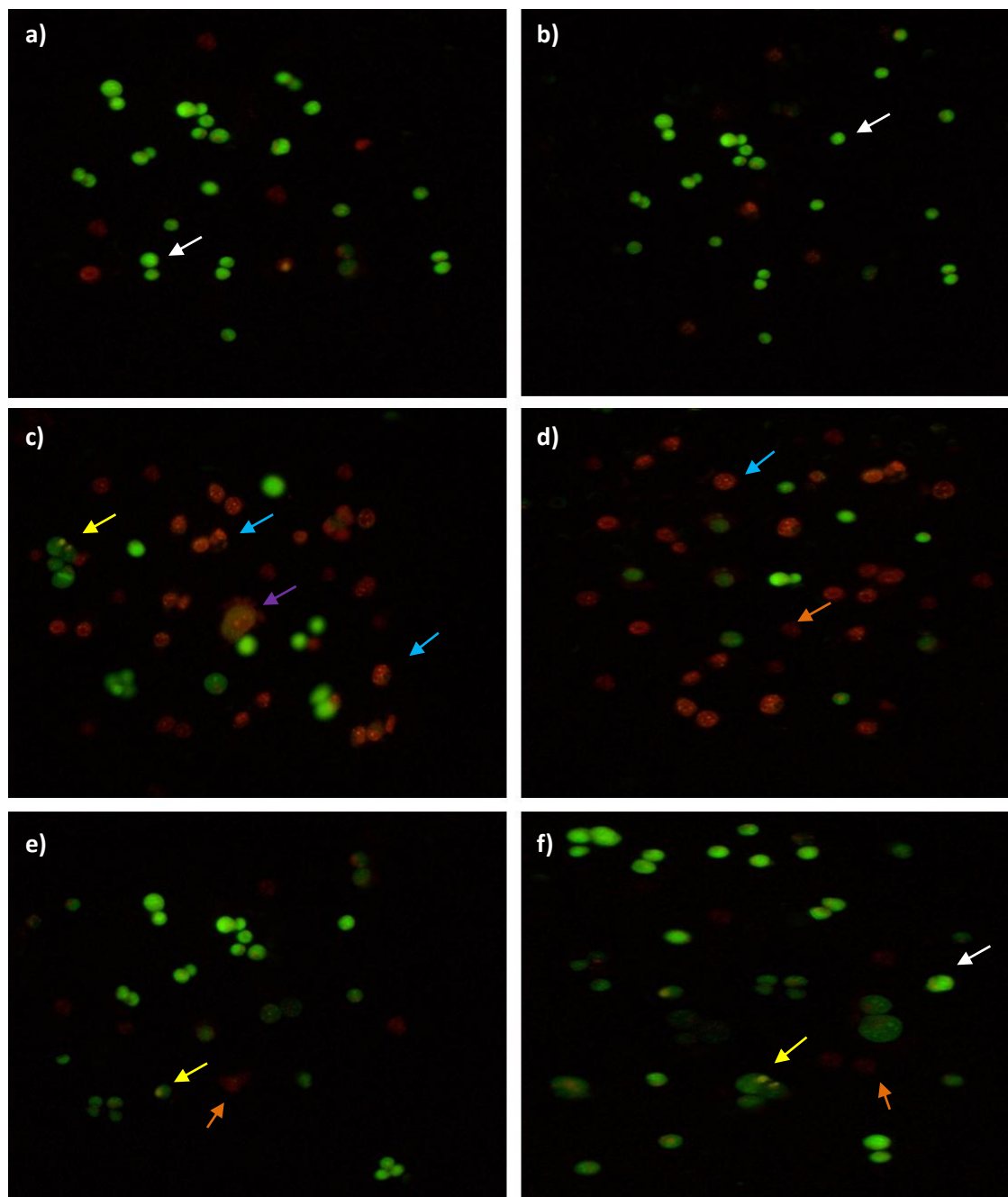


**Figura 38.** Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio de Hep3B control (**a-b**, 250X), transfectadas con HBV-X salvaje (**c-d**, 250X) y HBV-X mutada (**e-f**, 250X) del subgenotipo F4. Flechas blancas: células viables; flechas amarillas: células en apoptosis temprana; flechas celestes: células en apoptosis tardía; flechas naranjas: células necróticas.



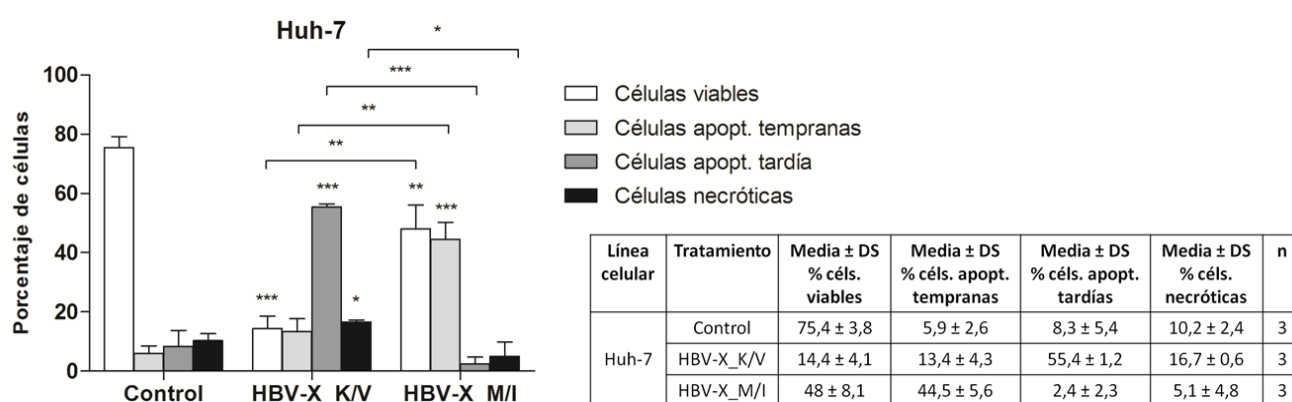
**Figura 39 y tabla 13.** Porcentaje de células viables, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas de Hep3B transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F4. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$  y \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Finalmente, en las células Huh-7 (Figuras 40-41 y tabla 14) el porcentaje de células viables (Figura 40, flechas blancas) disminuyó un 81 % en las que expresaban HBV-X\_K/V y un 36 % en las que expresaban HBV-X\_M/I, en relación al control. Las células en apoptosis temprana (Figura 40, flechas amarillas) aumentaron significativamente (654 %) en las que expresaban HBV-X\_M/I, en relación a las células control. Las células en apoptosis tardía (Figura 40, flechas celestes) mostraron incrementos del 567 % en las que expresaban HBV-X salvaje, en comparación con el control. Las células necróticas (Figura 40, flechas naranjas) presentaron aumentos significativos (64 %) en las transfectadas con HBV-X salvaje, en relación al control. La comparación de las células transfectadas con ambas HBV-X mostró una disminución del 70 % de las células viables en las transfectadas con HBV-X\_K/V y aumentos del 232 % de las células en apoptosis temprana en las transfectadas con HBV-X\_M/I, del 2208 % en las células en apoptosis tardía de las transfectadas con HBV-X salvaje, y del 223 % de las células necróticas en las que expresaban la forma salvaje, respecto de las que expresaban la forma mutada. La figura 40 muestra una célula apoptótica con el típico “*blebbing*” (flecha violeta).



**Figura 40.** Tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio de Huh-7 control (**a-b**, 250X), transfectadas con HBV-X salvaje (**c-d**, 250X) y HBV-X mutada (**e-f**, 250X) del subgenotipo F4. Flechas blancas: células viables; flechas amarillas: células en apoptosis temprana; flechas celestes: células en apoptosis tardía; flechas naranjas: células necróticas; flechas violetas: células apoptóticas con “blebbing”.

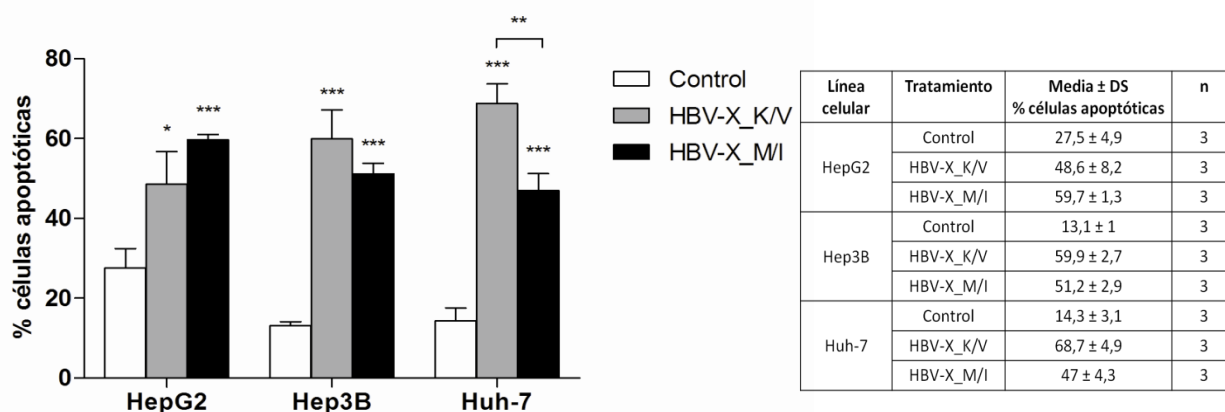




**Figura 41 y tabla 14.** Porcentaje de células viables, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas de Huh-7 transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F4. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$  y \*\*\*  $p < 0,0001$ .

En concordancia con los resultados obtenidos para el subgenotipo F1b, la expresión de ambas formas de HBV-X del subgenotipo F4 disminuye significativamente las células viables y aumenta el porcentaje de células en apoptosis temprana y tardía y de células necróticas, en las líneas de hepatoma estudiadas.

El porcentaje de células apoptóticas (temprana y tardía) en las líneas de hepatoma transfectadas se muestran en la figura 42 y la tabla 15. En los tres casos analizados, el porcentaje de células apoptóticas fue significativamente mayor en las células transfectadas con ambas HBV-X en comparación con las células control. En las HepG2 se evidenciaron aumentos del 77 % y del 117 % en las células transfectadas con HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I, respectivamente. Las Hep3B presentaron aumentos del 357 % para las que expresaban la forma salvaje y del 291 % para las que expresaban la forma mutada, en relación al control. Finalmente, las Huh-7 mostraron un aumento del 380 % en las que expresaban HBV-X salvaje y del 229 % en las que expresaban HBV-X mutada, respecto al control. El análisis comparativo en la inducción de apoptosis de las HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I, mostró diferencias significativas en las Huh-7, en las cuales la proteína salvaje produjo un 46 % más de células apoptóticas que la forma mutada. Adicionalmente, se observó un mayor porcentaje de células apoptóticas en las HepG2 que expresaban HBV-X\_M/I, y en las Hep3B que expresaban HBV-X\_K/V (diferencias no significativas).



**Figura 42 y tabla 15.** Porcentaje de células apoptóticas (tempranas y tardías) en células transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F4. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$  y \*\*\*  $p < 0,0001$ .

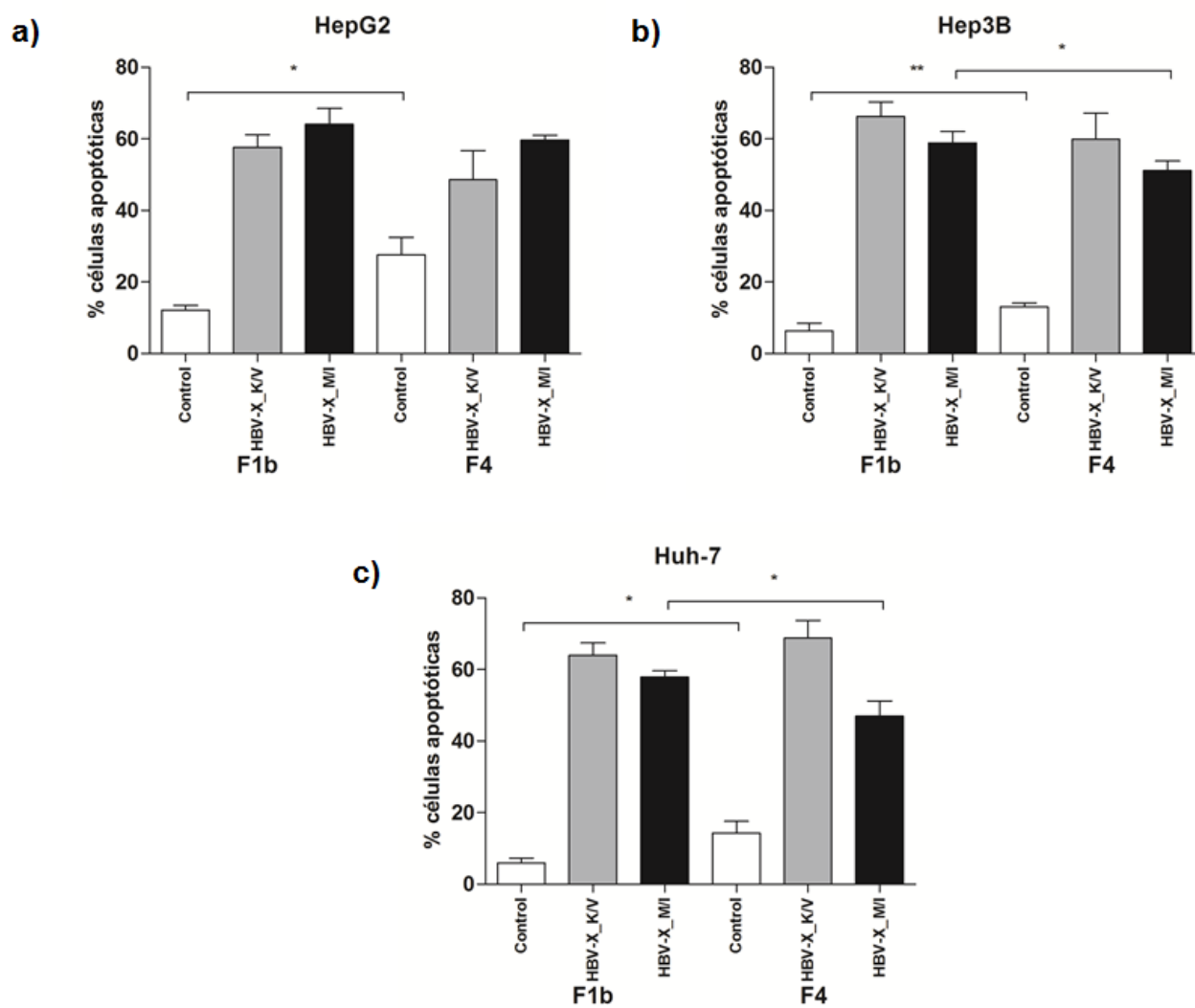
En resumen, los resultados obtenidos en los diferentes ensayos demuestran que la expresión transiente de las formas salvaje y mutada de la HBV-X del subgenotipo F4 induce la apoptosis en las tres líneas de hepatoma estudiadas.

#### 4.3. Comparación del porcentaje de células apoptóticas en los subgenotipos F1b y F4

La figura 43 surge de comparar los porcentajes de células apoptóticas obtenidos en las células transfectadas con las dos formas de HBV-X de ambos subgenotipos para cada línea celular.

Las HepG2 no mostraron diferencias significativas en los porcentajes de células apoptóticas comparando ambos subgenotipos de HBV-X (Figura 43, a). En Hep3B y Huh-7, el porcentaje de células apoptóticas fue un 15 % y un 23 % mayor en las que expresaban la proteína mutada F1b, respecto de las que expresaban la proteína mutada F4 (Figura 43, b y c). No se evidenciaron diferencias significativas en los porcentajes de células apoptóticas inducidos por la proteína salvaje de los dos subgenotipos.

Los resultados muestran que excepto para las HepG2, la forma mutada de HBV-X del subgenotipo F1b indujo mayores porcentajes de células apoptóticas.



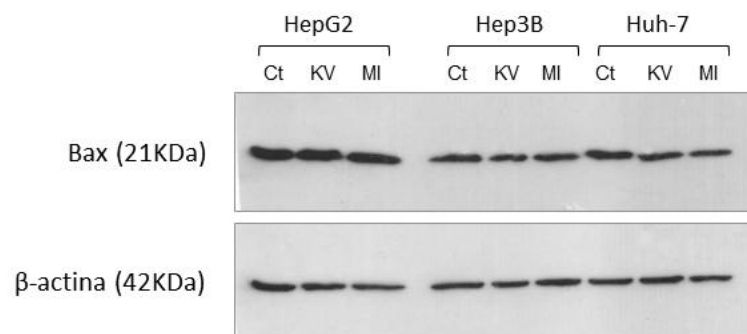
**Figura 43.** Comparación del porcentaje de células apoptóticas en células transfectadas con ambas formas de HBV-X F1b y F4, en HepG2 (a), Hep3B (b) y Huh-7 (c). \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,005$ .

## 5. EXPRESIÓN DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS DE BCL-2

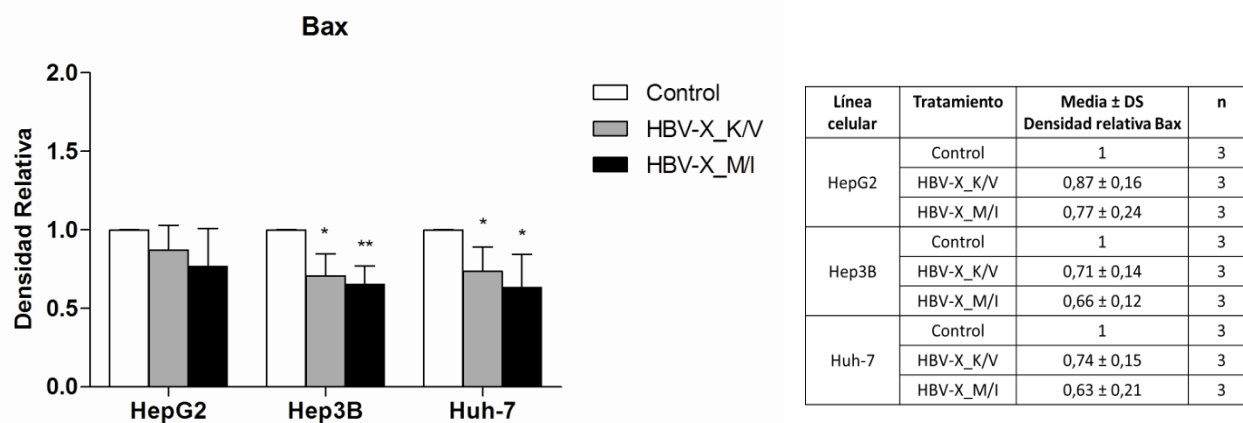
Para estudiar las vías apoptóticas de transducción de señales que pudieran ser afectadas por la expresión de HBV-X con distintas duplas de aminoácidos en 130-131, se analizó la expresión de las proteínas regulatorias de la familia de Bcl-2: estimuladores (Bax) o inhibidores (Bcl-2 y Bcl-X) de la apoptosis.

### 5.1. Subgenotipo F1b

Para el caso de la proteína pro-apoptótica Bax se observó una disminución significativa en su expresión en Hep3B y Huh-7 transfectadas con ambas formas de HBV-X, en relación a los controles. La figura 44 muestra un *Western Blot* para Bax. Las Hep3B mostraron disminuciones del 29 % y del 34 % en los niveles de expresión de Bax en células transfectadas con HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I, respectivamente y comparadas con los controles. En las Huh-7 la disminución en los niveles de expresión de Bax fue del 26 % para las transfectadas con la forma salvaje y del 37 % para las transfectadas con la forma mutada. No se evidenciaron diferencias significativas en los niveles de expresión de Bax cuando se realizó la comparación de los efectos inducidos por ambas formas de HBV-X en las tres líneas celulares. Los datos se grafican en la figura 45 y se resumen en la tabla 16.

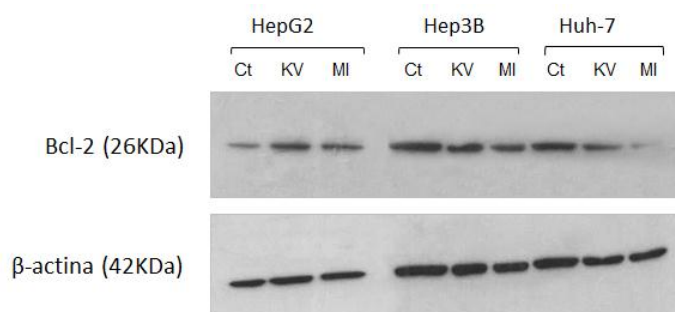


**Figura 44.** *Western Blot* de Bax en HepG2, Hep3B y Huh-7 transfectadas con plásmido control (Ct), HBV-X salvaje (KV) y HBV-X mutada (MI) del subgenotipo F1b. La β-actina fue utilizada como control de carga.

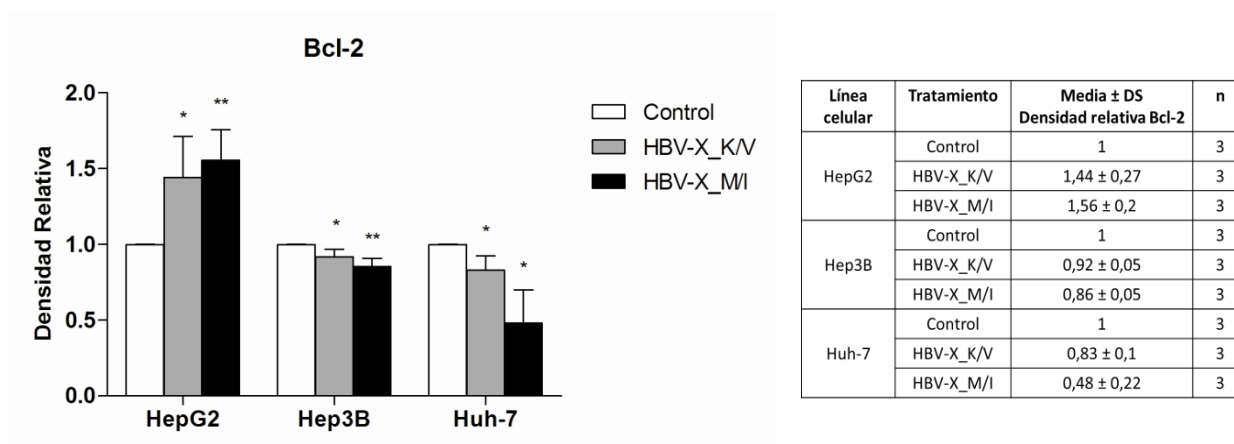


**Figura 45 y tabla 16.** Densitometrías del *Western Blot* de Bax en células transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F1b, normalizadas a la  $\beta$ -actina y relativizadas al control. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,005$ .

Los niveles de expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 aumentaron de manera significativa en HepG2 transfectadas con la proteína salvaje y mutada, en relación con las células control. El aumento fue del 44 % para las que expresaban HBV-X\_K/V y del 56 % para las que expresaban HBV-X\_M/I. Por el contrario, en Hep3B y Huh-7, los niveles de expresión de Bcl-2 disminuyeron significativamente, respecto a los controles. En las Hep3B, la expresión de Bcl-2 disminuyó un 8 % en las que expresaban la forma salvaje y un 14 % en las que expresaban la forma mutada, respecto de las células control. Por su parte, las Huh-7 mostraron disminuciones del 17 % y del 52 % en las transfectadas con la proteína salvaje y mutada, respectivamente, respecto de los controles. No se detectaron diferencias significativas en los efectos producidos por ambas formas de la proteína sobre los niveles la expresión de Bcl-2 para las tres líneas celulares analizadas. Los resultados se muestran en la figura 46 y se resumen en la figura 47 y la tabla 17.



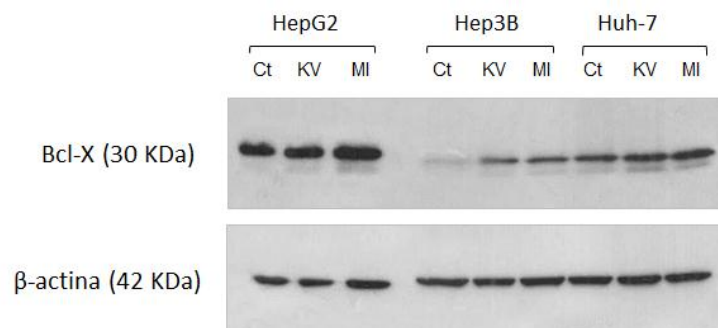
**Figura 46.** *Western Blot* de Bcl-2 en células transfectadas con plásmido control (Ct), HBV-X salvaje (KV) y HBV-X mutada (MI) del subgenotipo F1b. La β-actina fue utilizada como control de carga.



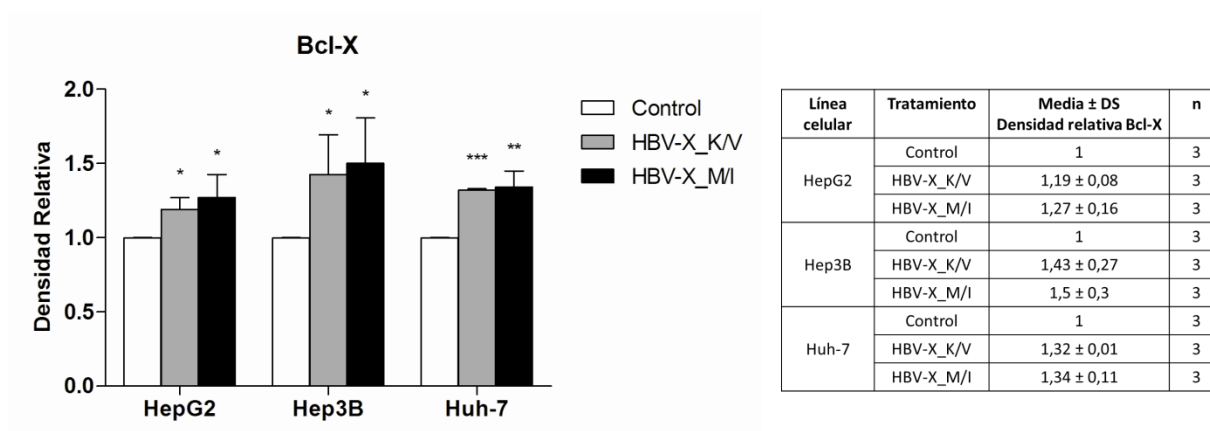
**Figura 47 y tabla 17.** Densitometrías del *Western Blot* de Bcl-2 en células transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F1b, normalizadas a la β-actina y relativizadas al control. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,005$ .

La proteína anti-apoptótica Bcl-X aumentó de manera significativa sus niveles de expresión en las tres líneas celulares transfectadas con HBV-X, en comparación al control (Figura 48). En HepG2, Bcl-X aumentó un 19 % en las transfectadas con HBV-X\_K/V y un 27 % en las transfectadas con HBV-X\_M/I. En Hep3B los niveles de Bcl-X aumentaron un 43 % y un 50 % para las transfectadas con la proteína salvaje y mutada respectivamente, en relación a los controles. Finalmente, en Huh-7, los niveles de Bcl-X aumentaron un 32 % en las que expresaban la HBV-X salvaje y un 34 % en las que expresaban la forma mutada. No se detectaron diferencias significativas en los efectos producidos por ambas

formas de la proteína sobre los niveles la expresión de Bcl-X para las tres líneas celulares analizadas (Figura 49 y tabla 18).



**Figura 48.** *Western Blot* de Bcl-X en células transfectadas con plásmido control (Ct), HBV-X salvaje (KV) y HBV-X mutada (MI) del subgenotipo F1b. La β-actina fue utilizada como control de carga.

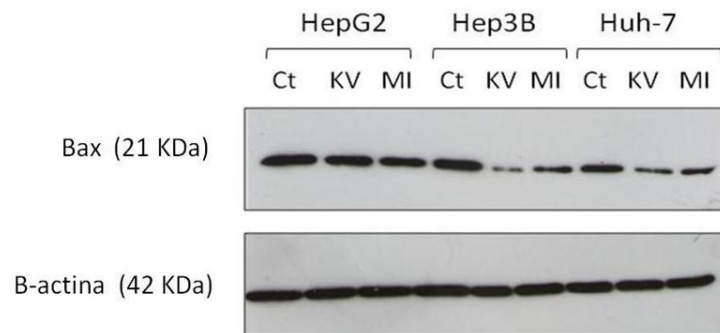


**Figura 49 y tabla 18.** Densitometrías del *Western Blot* de Bcl-X en células transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F1b, normalizadas a la β-actina y relativizadas al control. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$  y \*\*\*  $p < 0,005$ .

En resumen, los resultados presentados muestran que las HBV-X salvaje y mutada del subgenotipo F1b modulan los niveles de expresión de las proteínas pro y anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2 en células de hepatoma.

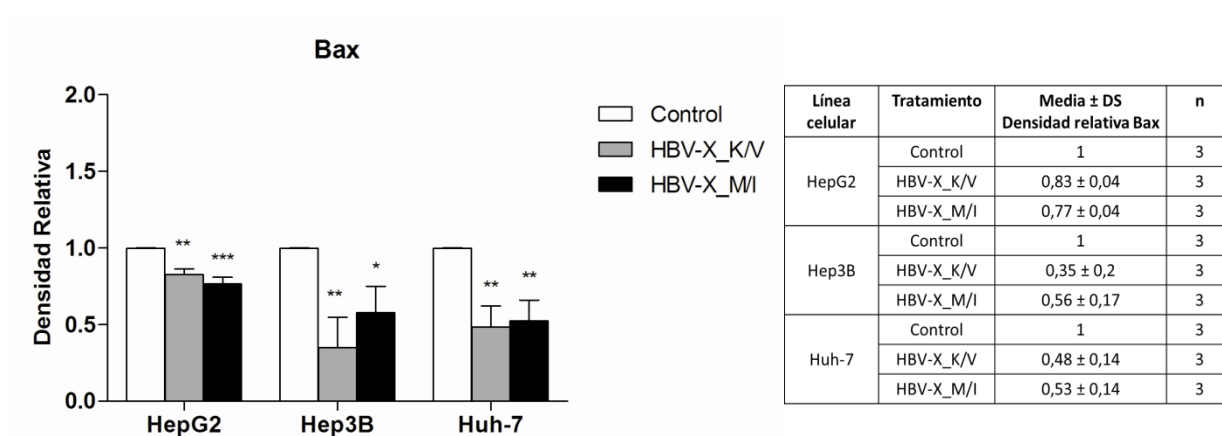
## 5.2. Subgenotipo F4

En las tres líneas celulares analizadas, la proteína pro-apoptótica Bax disminuyó su expresión en las transfectadas con ambas formas de HBV-X (salvaje y mutada), en relación a los controles. En HepG2, los niveles de expresión de Bax se redujeron un 17 % en las que expresaban HBV-X\_K/V y un 23 % en las que expresaban HBV-X\_M/I, en relación al control. Las Hep3B mostraron disminuciones del 65 % y del 44 % para las transfectadas con las formas salvaje y mutada, respectivamente. Finalmente, en las Huh-7, los niveles de expresión de Bax se redujeron un 52 % en las que expresaban HBV-X salvaje y un 47 % en las que expresaban HBV-X mutada. No se detectaron diferencias significativas en los efectos producidos por ambas formas de la proteína sobre los niveles la expresión de Bax para las tres líneas celulares analizadas. La figura 50 muestra un *Western Blot* para Bax, y la figura 51 y tabla 19 resumen los resultados.



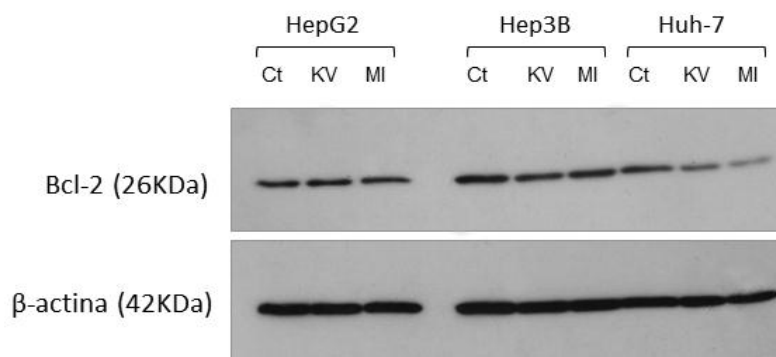
**Figura 50.** *Western Blot* de Bax en células transfectadas con plásmido control (Ct), HBV-X salvaje (KV) y HBV-X mutada (MI) del subgenotipo F4. La  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga.



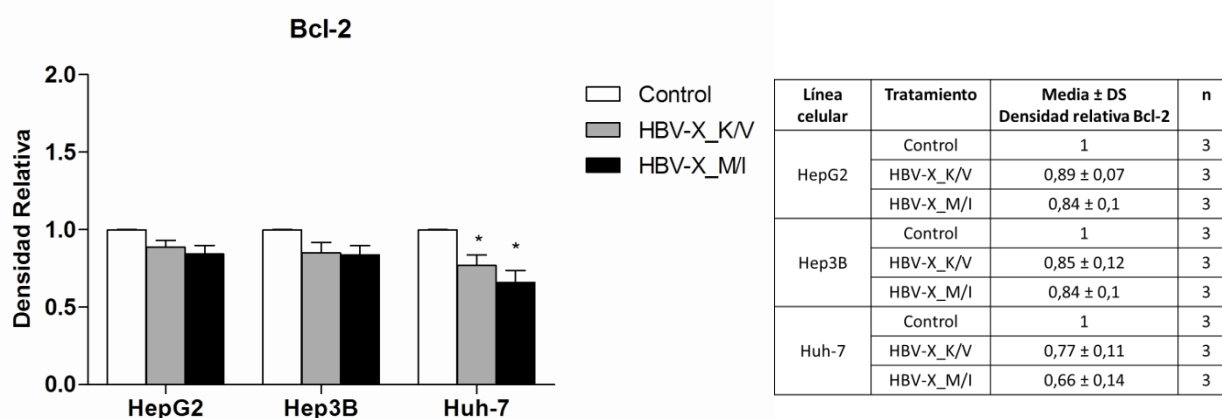


**Figura 51 y tabla 19.** Densitometrías del *Western Blot* de Bax en células transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F4, normalizadas a la  $\beta$ -actina y relativizadas al control. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  y \*\*\*  $p < 0,005$ .

La proteína Bcl-2 disminuyó significativamente su expresión únicamente en las células Huh-7 que expresaban la HBV-X salvaje y mutada. La disminución fue del 23 % para las que expresaban HBV-X\_K/V y del 34 % para las que expresaban HBV-X\_M/I, en comparación a los controles. En las HepG2 y Hep3B también se observó una leve disminución en los niveles de expresión de la proteína, sin embargo, las diferencias no resultaron significativas. Asimismo, tampoco se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de Bcl-2 cuando se analizaron comparativamente los efectos inducidos por las dos formas de la proteína (Figuras 52-53 y tabla 20).



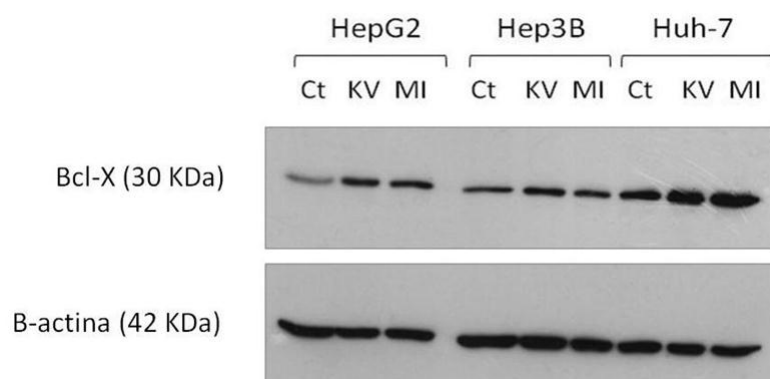
**Figura 52.** *Western Blot* de Bcl-2 en células transfectadas con plásmido control (Ct), HBV-X salvaje (KV) y HBV-X mutada (MI) del subgenotipo F4. La  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga.



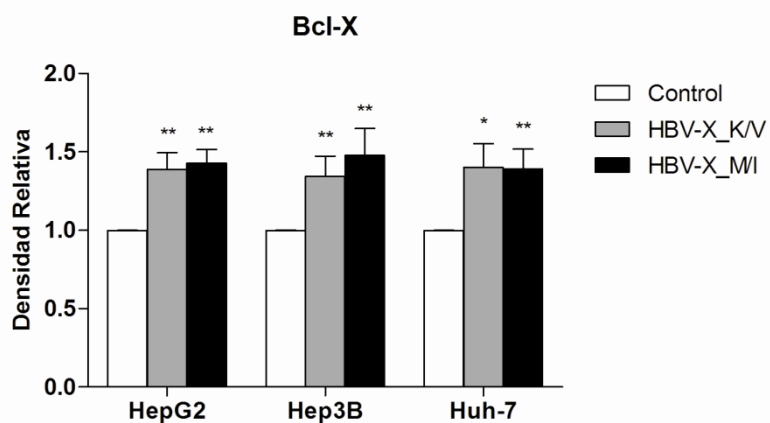
**Figura 53 y tabla 20.** Densitometrías del *Western Blot* de Bcl-2 en células transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F4, normalizado a la  $\beta$ -actina y relativizado al control. \*  $p < 0,05$ .

La proteína Bcl-X aumentó significativamente sus niveles de expresión en las tres líneas celulares expresando ambas HBV-X (Figura 54). En HepG2 el aumento fue del 39 % para las que expresaban la HBV-X salvaje y del 43 % para las que expresaban la forma mutada, en relación al control. En Hep3B los niveles de Bcl-X aumentaron un 34 % y un 48 % para las transfectadas con HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I, respectivamente. Las Huh-7 mostraron aumentos del 40 % en las que expresaban la proteína salvaje y del 39 % para las que expresaban la forma mutada. No se detectaron diferencias significativas en los

niveles de expresión de Bcl-X cuando se analizaron comparativamente los efectos inducidos por las dos formas de la proteína. Los resultados se grafican en la figura 55 y se resumen en la tabla 21.



**Figura 54.** *Western Blot* de Bcl-X en células transfectadas con plásmido control (Ct), HBV-X salvaje (KV) y HBV-X mutada (MI) del subgenotipo F4. La  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga.



Línea celular	Tratamiento	Media $\pm$ DS	n
HepG2	Control	1	3
	HBV-X_K/V	1,39 $\pm$ 0,11	3
	HBV-X_M/I	1,43 $\pm$ 0,09	3
Hep3B	Control	1	3
	HBV-X_K/V	1,34 $\pm$ 0,13	3
	HBV-X_M/I	1,48 $\pm$ 0,17	3
Huh-7	Control	1	3
	HBV-X_K/V	1,4 $\pm$ 0,15	3
	HBV-X_M/I	1,39 $\pm$ 0,13	3

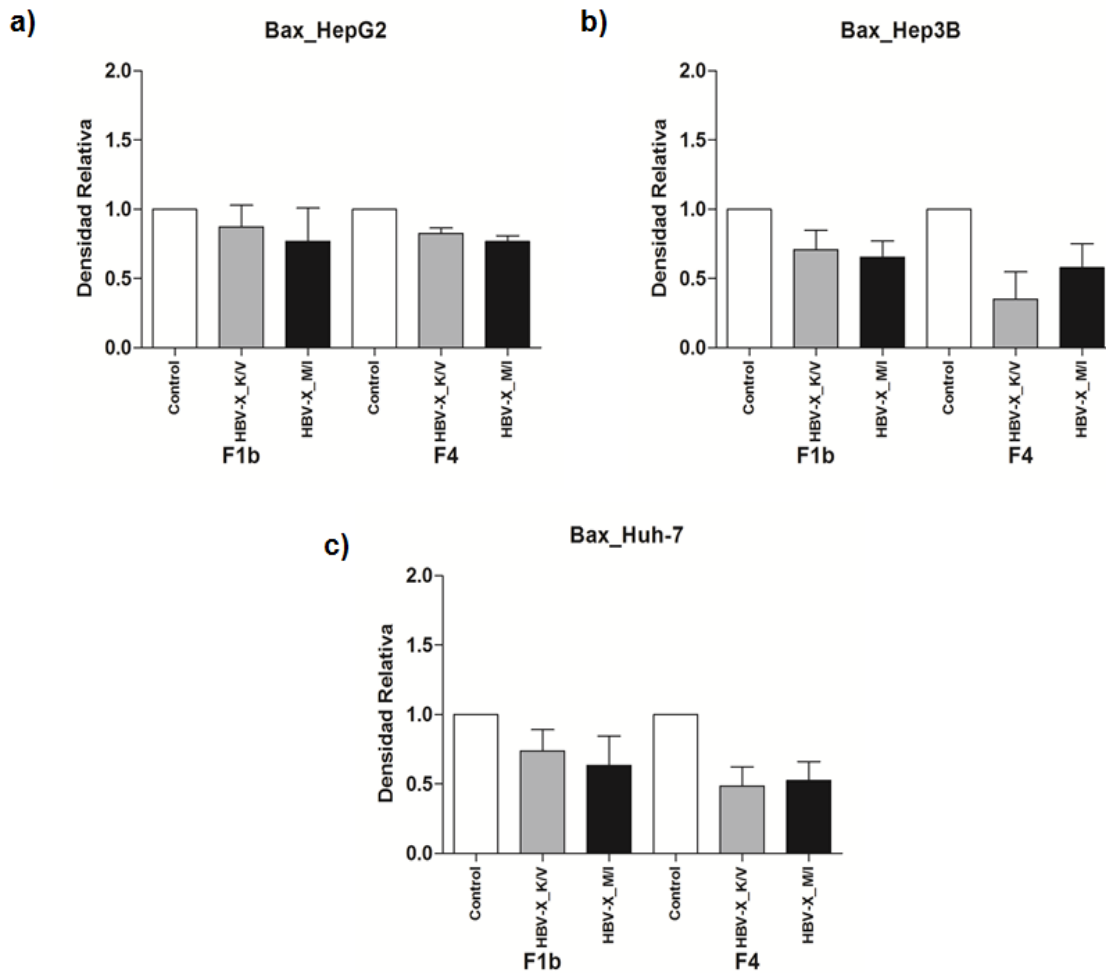
**Figura 55 y tabla 21.** Densitometrías del *Western Blot* de Bcl-X en células transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y n HBV-X\_M/I del subgenotipo F4, normalizadas a la  $\beta$ -actina y relativizadas al control. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,005$ .

En resumen, los resultados indican que las formas salvaje y mutada de HBV-X del subgenotipo F4 modulan la expresión de las proteínas regulatorias anti y pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2.

### 5.3. Comparación de la expresión de las proteínas de la familia de Bcl-2 en los subgenotipos F1b y F4

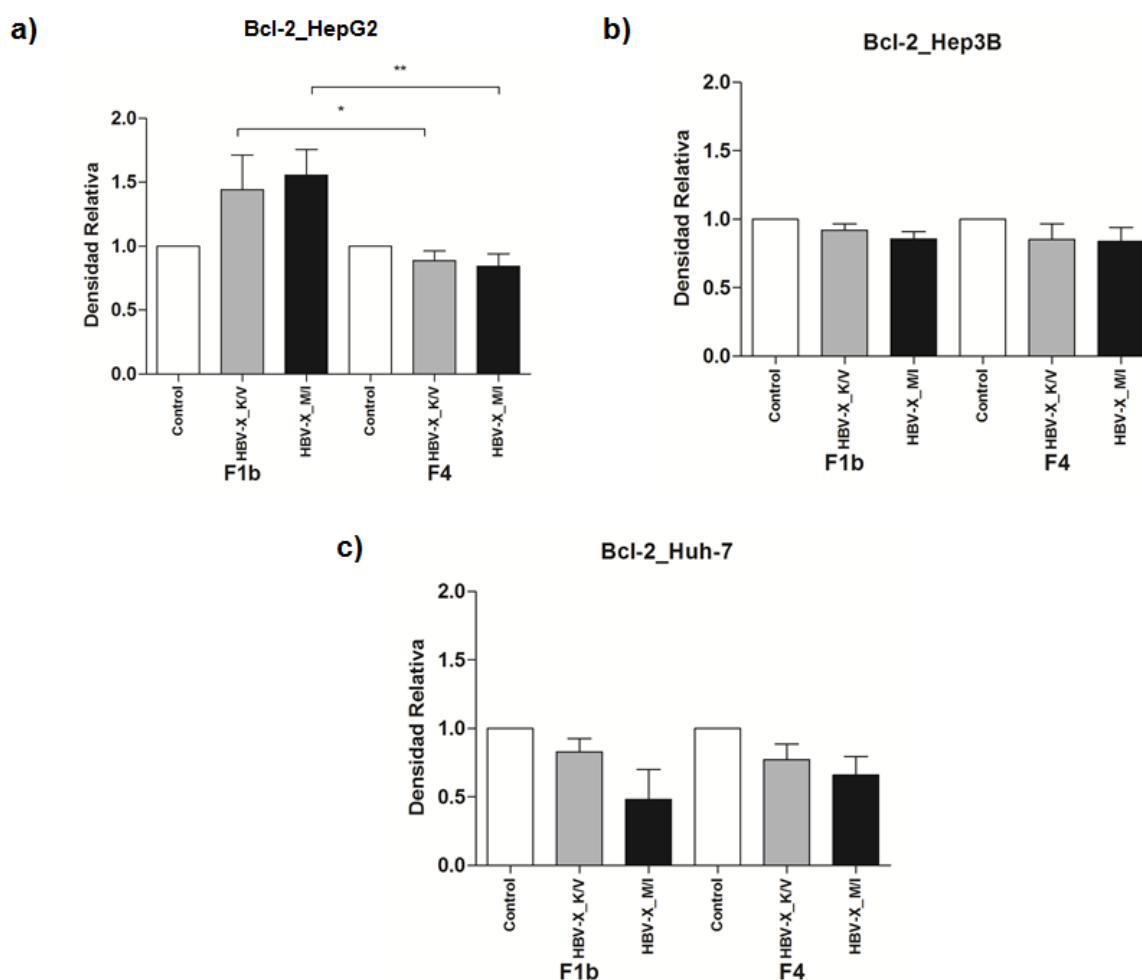
Las figuras 56-58 representan el análisis de la comparación de los niveles de expresión de las proteínas anti y pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 en células transfectadas con HBV-X salvaje y mutada, F1b y F4.

La proteína Bax mostró niveles similares de expresión para ambos subgenotipos en las tres líneas celulares estudiadas (Figura 56, a, b y c).



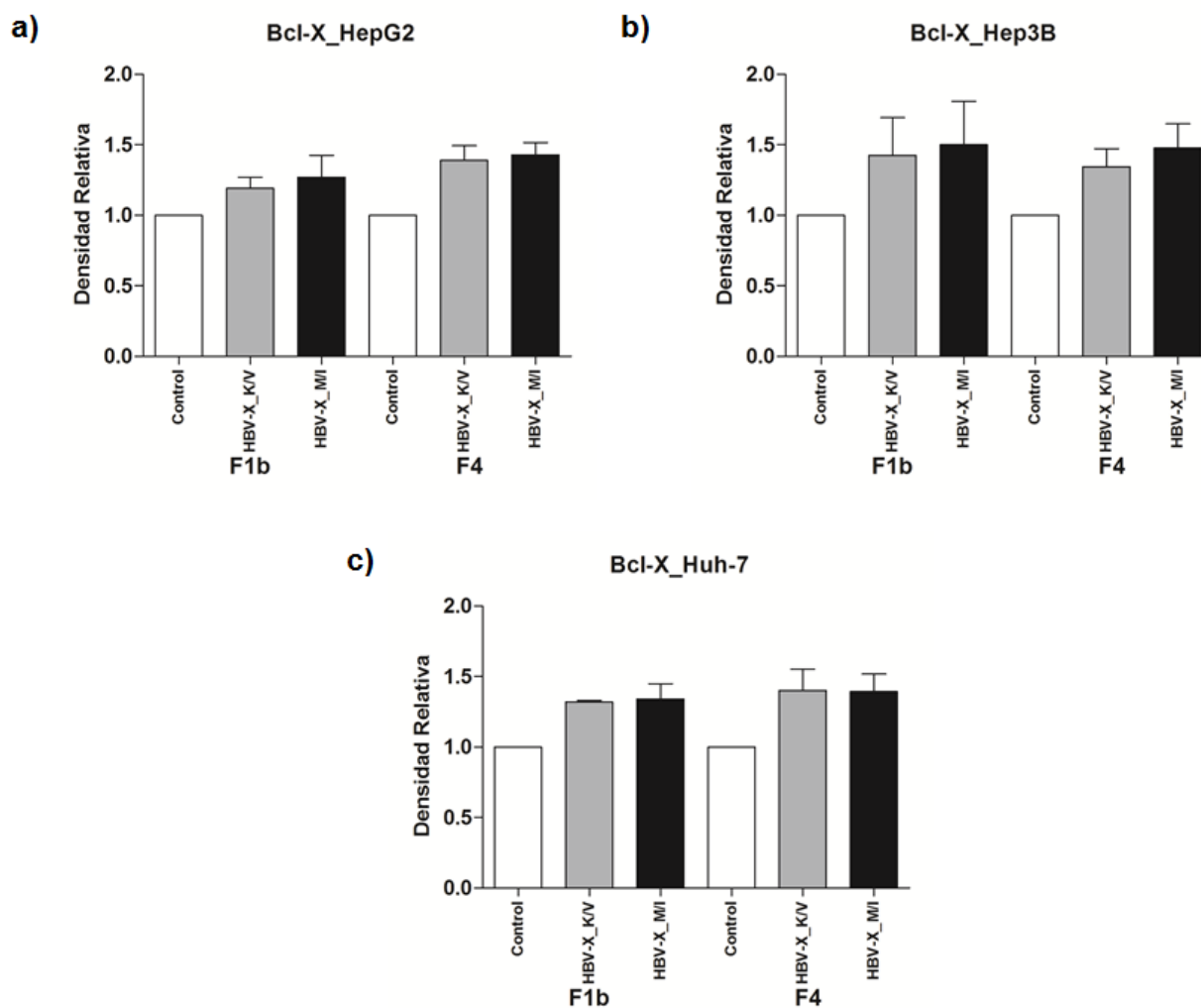
**Figura 56.** Comparación de la expresión de Bax en células transfectadas con ambas formas de la HBV-X, subgenotipos F1b y F4 en HepG2 (a), Hep3B (b) y Huh-7 (c).

Para Bcl-2, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión afectados por HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I de ambos subgenotipos (F1b y F4) en Hep3B y Huh-7 (Figura 57, b y c). Sin embargo, en HepG2, las células que expresaban las dos formas de HBV-X subgenotipo F1b mostraron aumentos significativos en los niveles de Bcl-2, con respecto a las células transfectadas con HBV-X del subgenotipo F4 (Figura 57, a). Los aumentos fueron del 62 % para las que expresaban la proteína salvaje F1b, respecto de las que expresaban HBV-X\_K/V F4 y del 86 % para las que expresaban la proteína mutada F1b, respecto de las que expresaban HBV-X\_M/I F4.



**Figura 57.** Comparación de la expresión de Bcl-2 en células transfectadas con ambas formas de HBV-X, subgenotipos F1b y F4 en HepG2 (a), Hep3B (b) y Huh-7 (c).

Para Bcl-X no se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de la misma luego de las transfecciones con ambas HBV-X, subgenotipos F1b y F4 en las células transfectadas (Figura 58).



**Figura 58.** Comparación de la expresión de Bcl-X en células transfectadas con ambas formas de la HBV-X, subgenotipos F1b y F4 en HepG2 (a), Hep3B (b) y Huh-7 (c).

En resumen, los resultados muestran que, con excepción de los niveles de Bcl-2, los cuales resultaron mayores para el subgenotipo F1b para ambas HBV-X en HepG2, no se registraron diferencias significativas en los niveles de expresión de las proteínas de la familia de Bcl-2 analizadas en las tres líneas celulares expresando transientemente HBV-X salvaje y mutada de ambos subgenotipos.

## 6. INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA

Para determinar si la expresión de HBV-X salvaje y mutada subgenotipos F1b y F4 era capaz de inducir la autofagia en células de hepatoma humano, se estudió este proceso mediante la detección de estructuras autofágicas típicas por microscopía electrónica de transmisión y la conversión de LC3, por *Western Blot*.

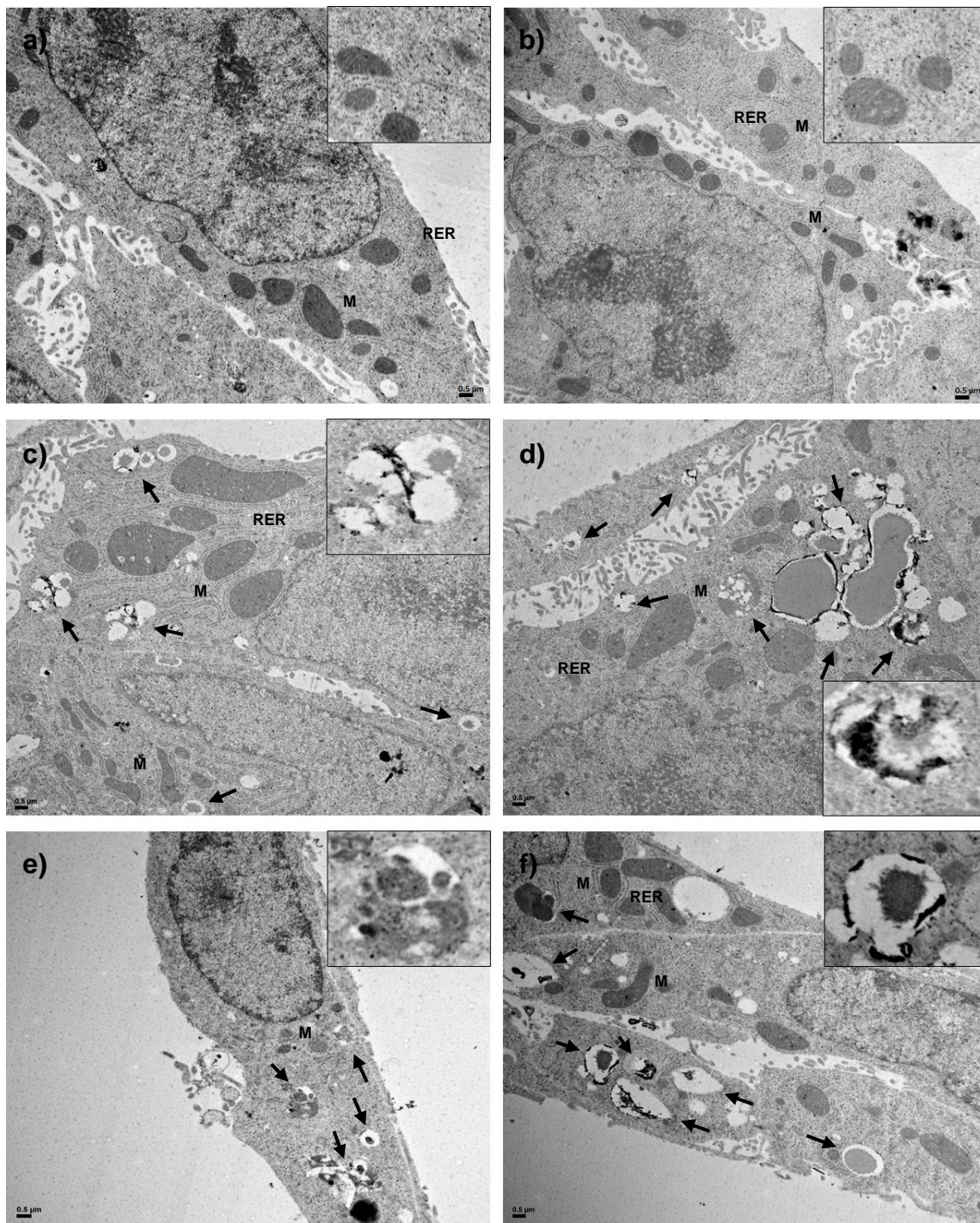
### 6.1. Subgenotipo F1b

#### 6.1.a Detección de vacuolas autofágicas por microscopía electrónica

Las células transfectadas se fijaron con glutaraldehído, se realizaron los cortes correspondientes y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión en búsqueda de las típicas estructuras autofágicas.

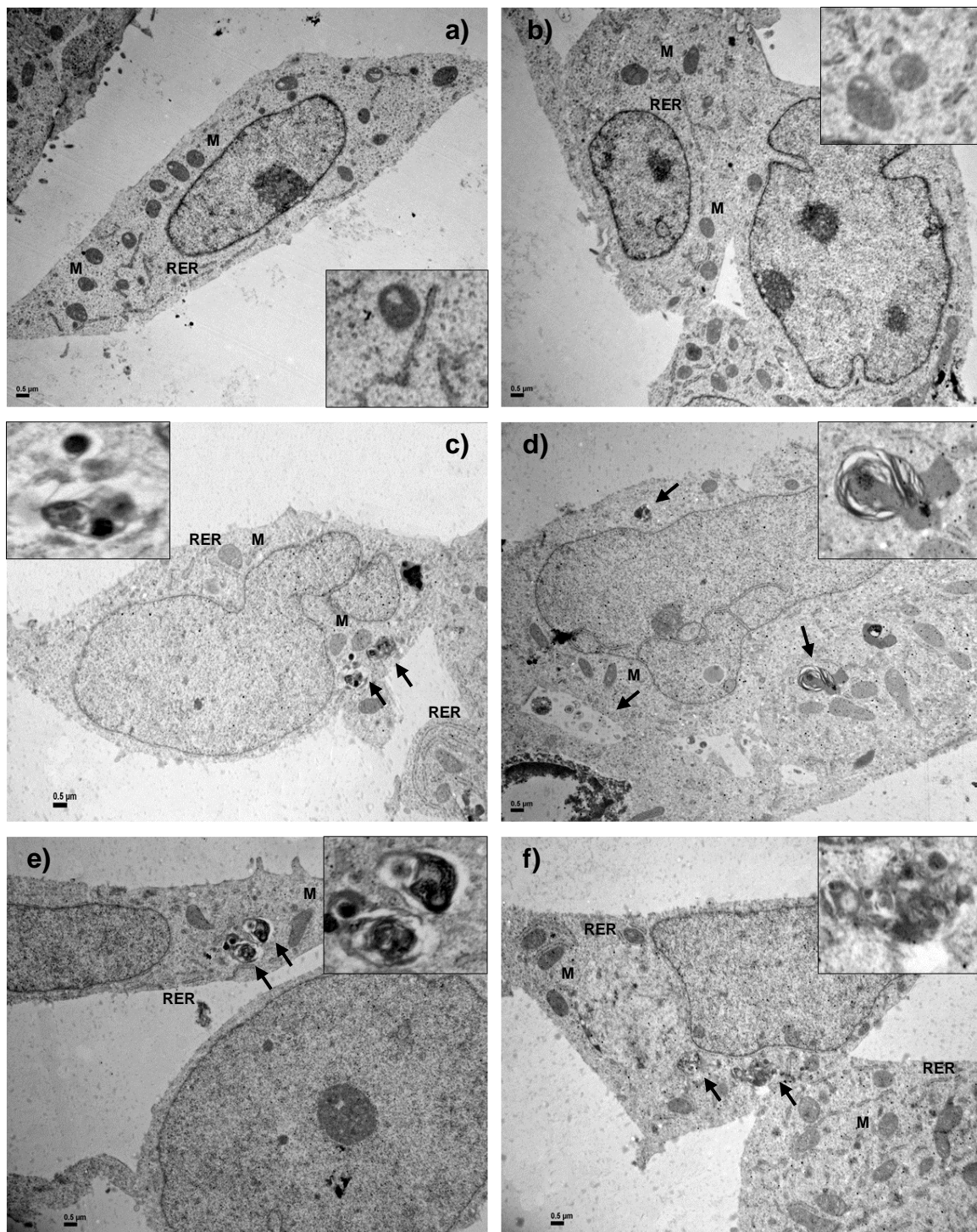
Las células transfectadas con el plásmido control raramente presentaron alguna estructura compatible con vacuolas autofágicas (Figuras 59-61, a-b). Por el contrario, en las células transfectadas con ambas formas de HBV-X se observaron abundantes vacuolas autofágicas (Figuras 59-61, c-f, flechas negras) en distintas etapas o estadios del proceso, incluyendo membranas de aislamiento (saco vesicular en forma de copa), autofagosomas (compartimentos de doble membrana con material citoplasmático y/u organelas) y autolisosomas (compartimentos de membrana simple conteniendo material citoplasmático en varias etapas de degradación). No se observaron diferencias en el tipo ni el número de vacuolas autofágicas en las células con expresión de HBV-X cuando se analizó comparativamente el efecto que producían ambos tipos de HBV-X.

Además, cabe mencionar que como consecuencia de la expresión de ambas variantes de HBV-X se evidenciaron alteraciones en las mitocondrias, las cuales presentaban cambios de tamaño y crestas desorganizadas, en comparación a las mitocondrias de los controles. Particularmente, las HepG2 que expresaban HBV-X salvaje presentaron mitocondrias de un tamaño significativamente mayor, respecto de las mitocondrias observadas en las células control (Figura 59, c-d).

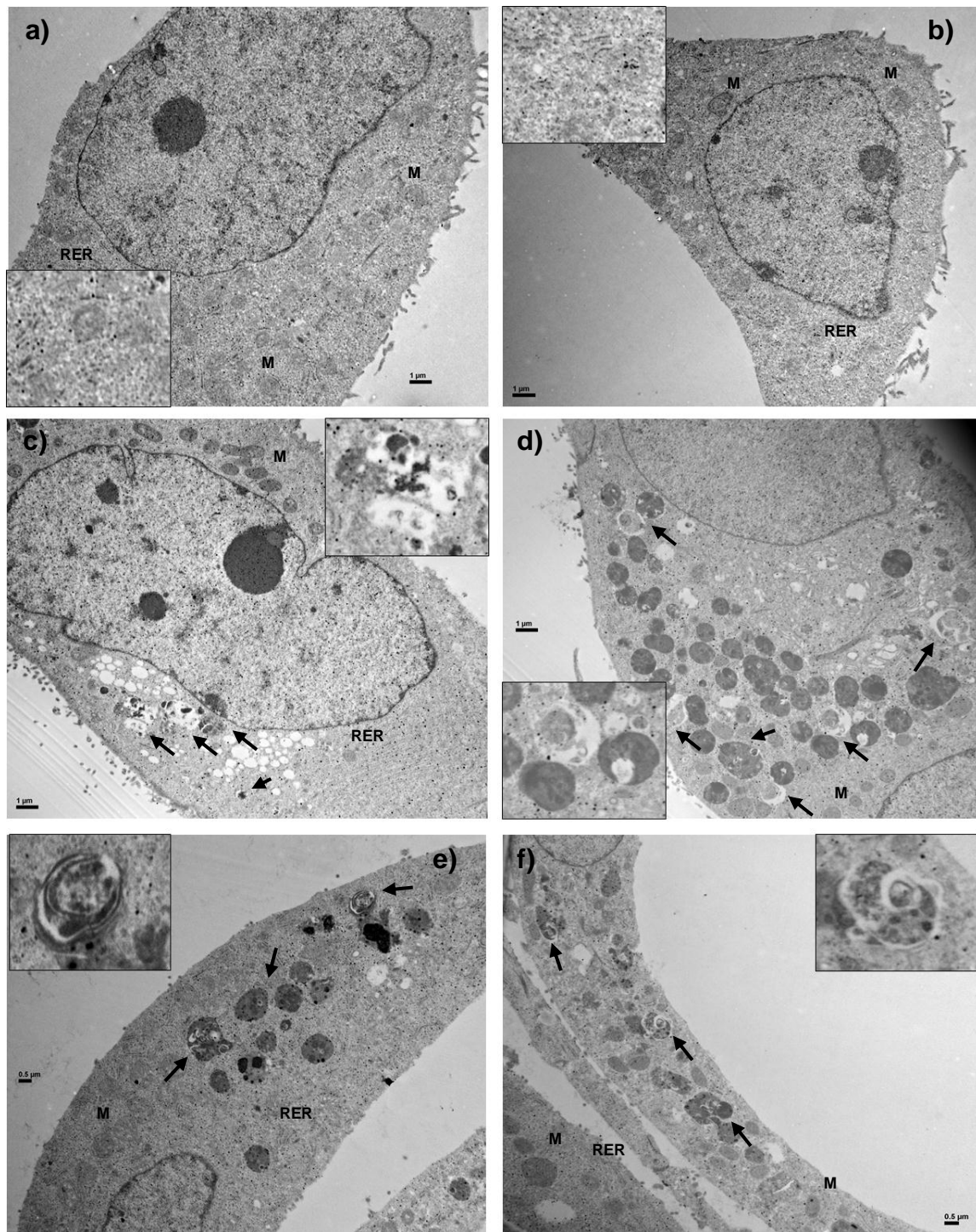


**Figura 59.** Microscopía electrónica de HepG2 transfectadas con plásmido control (a-b), HBV-X salvaje (c-d) y HBV-X mutada (e-f) del subgenotipo F1b. Flechas negras: estructuras autofágicas. M: mitocondrias. RER: retículo endoplásmico rugoso. Recuadro: ampliación.





**Figura 60.** Microscopía electrónica de células de la línea Hep3B transfectadas con plásmido control (a-b), HBV-X salvaje (c-d) y HBV-X mutada (e-f) del subgenotipo F1b. Flechas negras: estructuras autofágicas. M: mitocondrias. RER: retículo endoplásmico rugoso. Recuadro: ampliación.



**Figura 61.** Microscopía electrónica de células Huh-7 transfectadas con plásmido control (a-b), HBV-X salvaje (c-d) y HBV-X mutada (e-f) del subgenotipo F1b. Flechas negras: estructuras autofágicas. M: mitocondrias. RER: retículo endoplásmico rugoso. Recuadro: ampliación.

Estos resultados sugieren que la expresión de ambas HBV-X del subgenotipo F1b inducen la autofagia en las tres líneas de hepatoma estudiadas.

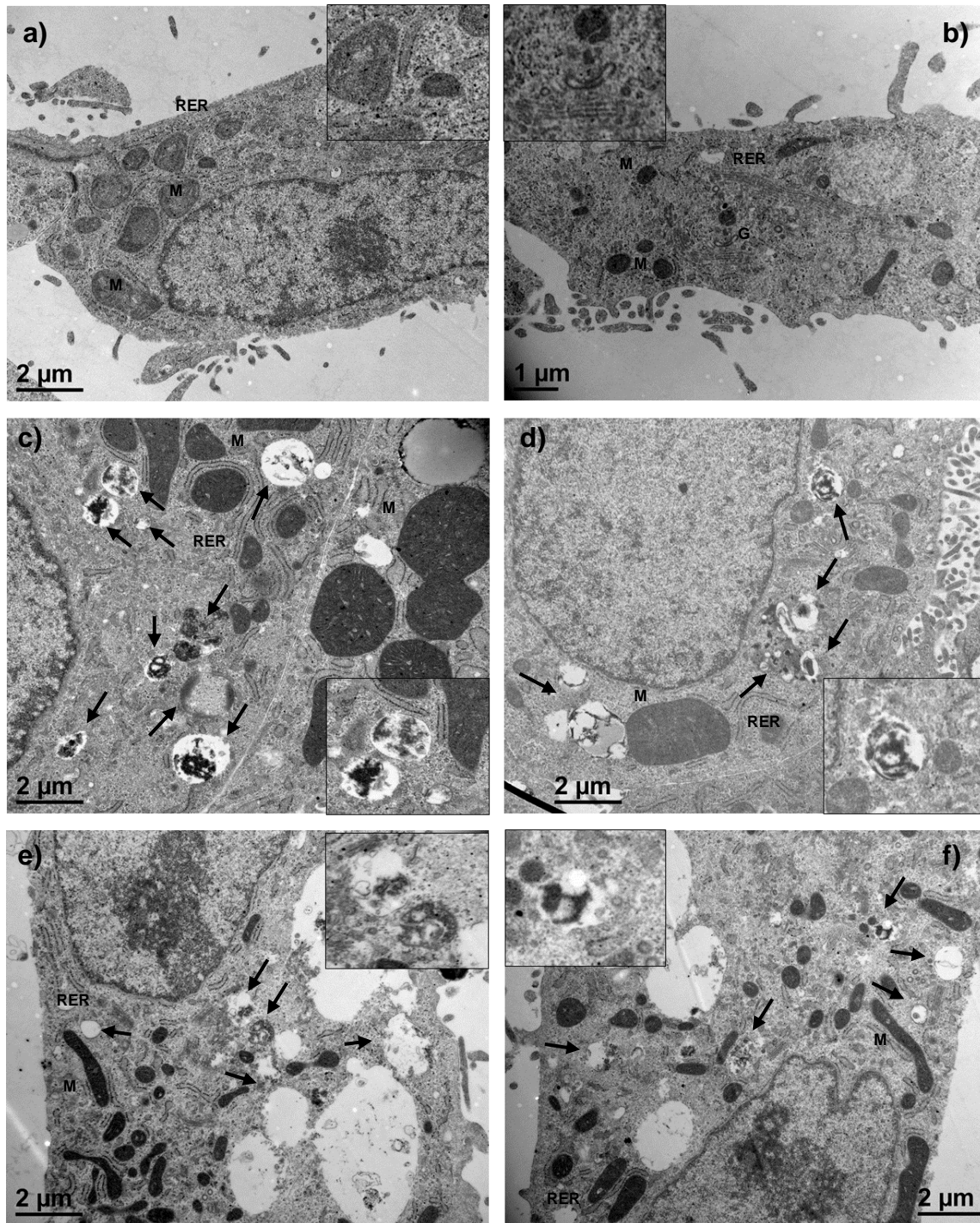
## **6.2. Subgenotipo F4**

### **6.2.a Detección de vacuolas autofágicas por microscopía electrónica**

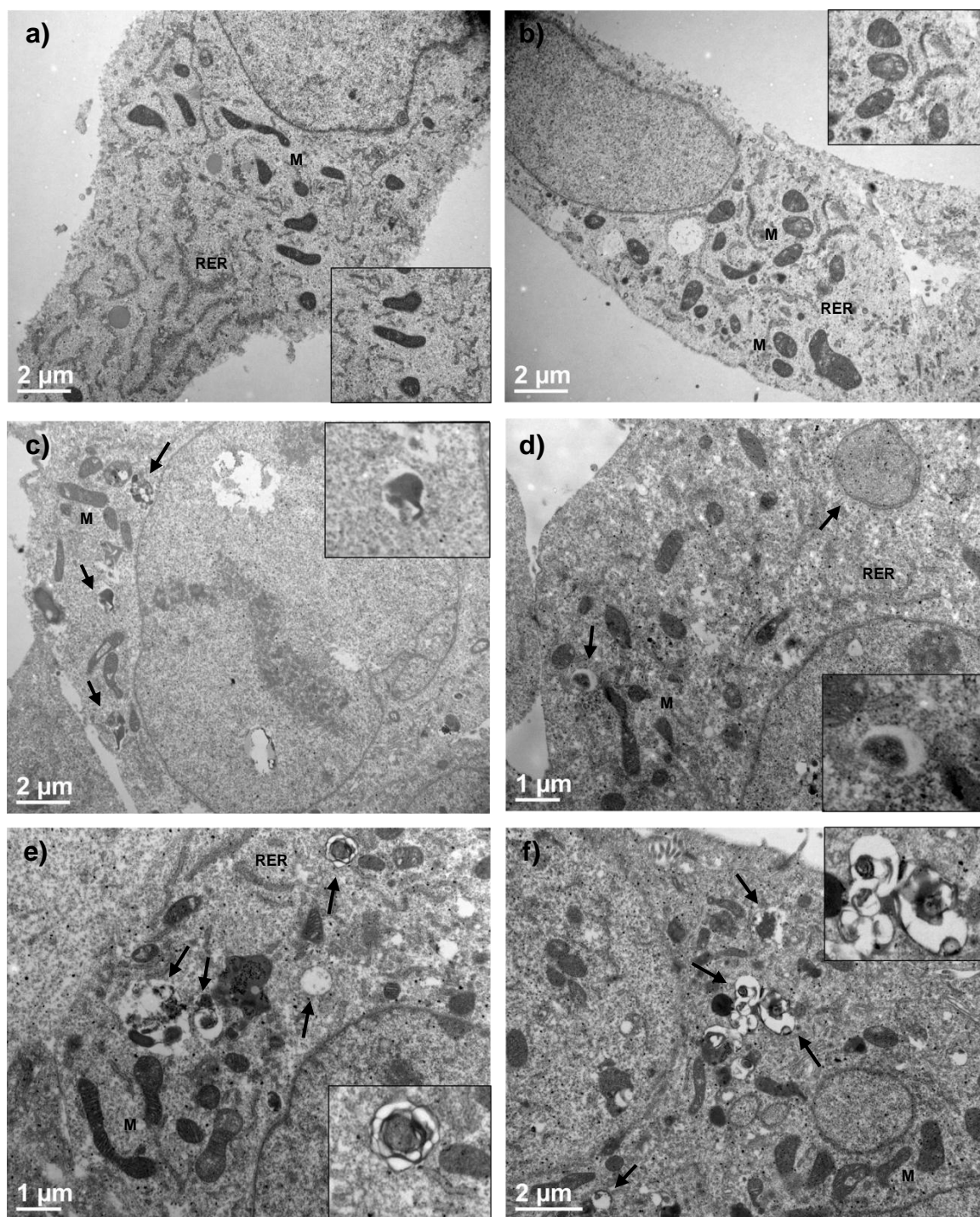
Para analizar si la expresión de HBV-X salvaje y mutada del subgenotipo F4 induce el proceso autofágico en células de hepatoma humano, las células se fijaron con glutaraldehído, se realizaron los cortes y preparados correspondientes y se observaron en un microscopio electrónico. Las figuras 62-64 muestran las imágenes obtenidas.

En las tres líneas celulares estudiadas, las células control mostraban morfología normal (citoplasma granuloso, mitocondrias redondeadas con crestas visibles, abundante retículo endoplásmico rugoso y complejo de Golgi, Figuras 62-64, a-b). Sin embargo, tanto las células que expresaban la proteína salvaje (Figuras 62-64, c-d), como aquellas que expresaban la proteína mutada (Figuras 62-64, e-f) mostraron un gran número de vacuolas citoplasmáticas en distintos estadios del proceso autofágico.

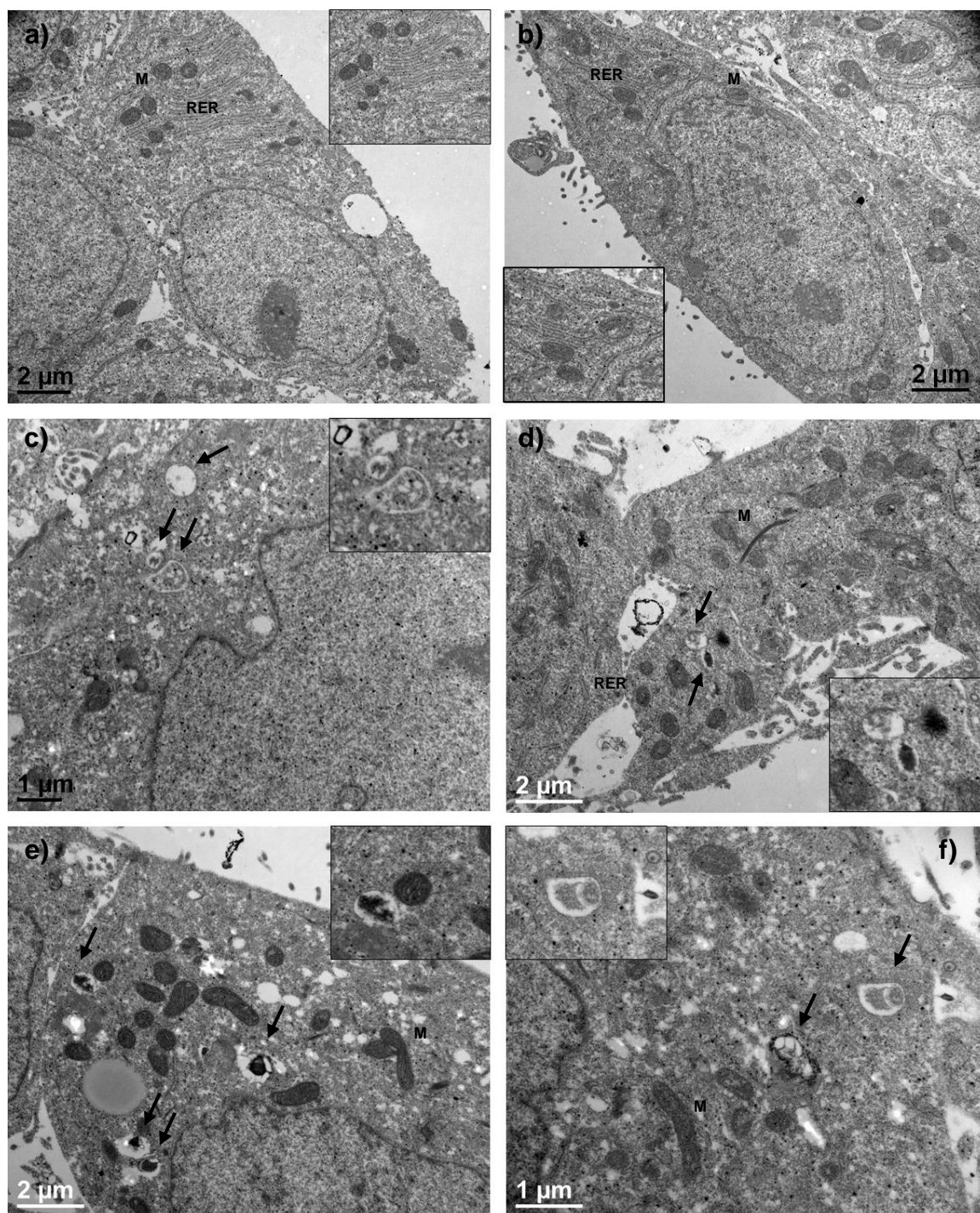
En concordancia con los resultados obtenidos en las células transfectadas con HBV-X subgenotipo F1b, las mitocondrias de las células que expresaban ambas variantes de HBV-X F4 mostraron una morfología alterada. Estas mitocondrias presentaban forma alargada, con crestas más visibles y desorganizadas. Coincidiendo con lo observado para el F1b, las mitocondrias de las HepG2 con expresión de HBV-X salvaje se caracterizaban por su gran tamaño (Figura 62, c-d).



**Figura 62.** Microscopía electrónica de HepG2 transfectadas con plásmido control (a-b), HBV-X salvaje (c-d) y HBV-X mutada (e-f) del subgenotipo F4. Flechas negras: estructuras autofágicas. M: mitocondrias. RER: retículo endoplásmico rugoso. G: aparato de Golgi. Recuadro: ampliación.



**Figura 63.** Microscopía electrónica de Hep3B transfectadas con plásmido control (a-b), HBV-X salvaje (c-d) y HBV-X mutada (e-f) del subgenotipo F4. Flechas negras: estructuras autofágicas. M: mitocondrias. RER: retículo endoplásmico rugoso. Recuadro: ampliación.



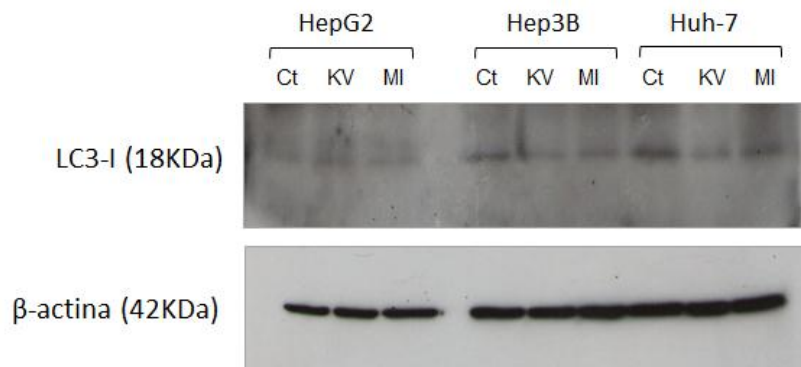
**Figura 64.** Microscopía electrónica de Huh-7 transfectadas con plásmido control (a-b), HBV-X salvaje (c-d) y HBV-X mutada (e-f) del subgenotipo F4. Flechas negras: estructuras autofágicas. M: mitocondrias. RER: retículo endoplásmico rugoso. Recuadro: ampliación.

### 6.2.b. Detección de LC3

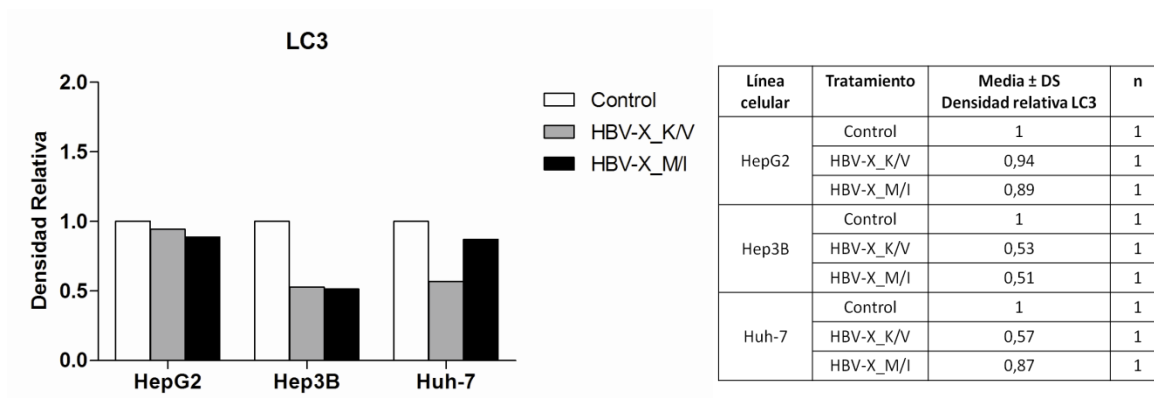
Otra forma de estudiar el proceso de autofagia es analizar la conversión de la proteína LC3 de su forma citoplasmática (LC3-I, 18 KDa) a su forma lipidada (LC3-II, 16 KDa). LC3 es inicialmente sintetizada como una forma no procesada denominada pro-LC3 que rápidamente es clivada proteolíticamente en su extremo C-terminal para convertirse en LC3-I. Al inducirse la autofagia, LC3-I es conjugada con un residuo de fosfatidiletanolamina en su extremo C-terminal para convertirse en la forma lipidada, LC3-II. La forma no procesada de LC3 y LC3-I son solubles y se encuentran localizadas en el citoplasma, por el contrario LC3-II se encuentra asociada en la membrana interna y externa del autofagosoma, siendo la única molécula presente exclusivamente en los autofagosomas (Mizushima et al., 2010).

La expresión de ambas formas de LC3 se estudió por *Western Blot*. Como se observa en la figura 65, se evidenció un descenso en la expresión de LC3-I (18 KDa), particularmente en Hep3B y Huh-7 transfectadas con ambas formas de HBV-X del subgenotipo F4, en relación a las células control. La densitometría para este experimento se muestra en la figura 66.

La disminución de los niveles de LC3-I sería compatible con la formación de LC3-II, sin embargo, dadas las dificultades que presentan los métodos de detección de la misma esta forma de la proteína no pudo detectarse en los distintos ensayos realizados.



**Figura 65.** *Western Blot* de LC3 en células transfectadas con plásmido control (Ct), HBV-X salvaje (KV) y HBV-X mutada (MI) del subgenotipo F4. La β-actina fue utilizada como control de carga.



**Figura 66 y tabla 22.** Densitometría del *Western Blot* de LC3 en células transfectadas con plásmido control, HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I, normalizada a la  $\beta$ -actina y relativizada al control.

En resumen, los resultados presentados sugieren que como consecuencia de la expresión de HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I del subgenotipo F4 se induce el proceso de autofagia en las tres líneas celulares estudiadas.



# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

La HBV-X es una proteína regulatoria multifuncional capaz de regular una gran variedad de procesos virales y celulares, tales como la replicación viral, la transcripción génica, las vías intracelulares de transducción de señales, la progresión del ciclo celular, la reparación del ADN, la proliferación celular, la degradación de proteínas, como así también, los procesos de apoptosis y de autofagia. La capacidad de HBV-X de modular la viabilidad celular le confiere a esta proteína un rol fundamental en la patogenia de la infección por HBV y en el posterior desarrollo de HCC (Rawat et al., 2012).

Varias mutaciones ocurren en el genoma del HBV durante el curso de la infección persistente, existiendo cada vez más evidencias de la asociación entre estas alteraciones moleculares y el desarrollo de HCC en los pacientes infectados. Las mutaciones del BCP en los nucleótidos 1762 y 1764 (A1762T/G1764A) están asociadas a la seroconversión del HBeAg y la replicación viral persistente, y se encuentran con frecuencia en pacientes con enfermedad hepática avanzada (Baptista et al., 1999; Blackberg y Kidd-Ljunggren, 2003; Kao et al., 2003; Huang et al., 2011). Dada la superposición de los marcos de lectura en el genoma del HBV, las mutaciones en el BCP también afectan al gen X, y por consiguiente, a HBV-X. La doble mutación A1762T/G1764A resulta en la sustitución de un residuo de lisina por un residuo de metionina en el codón 130, y en el cambio de valina por isoleucina en el codón 131, respectivamente. Estos cambios en la secuencia aminoacídica de HBV-X podrían afectar las múltiples funciones biológicas de la proteína y, consecuentemente, su rol en la patogénesis de la infección crónica.

El objetivo de esta Tesis Doctoral fue analizar los cambios en la actividad biológica de HBV-X que resultan como consecuencia de las mutaciones en los aminoácidos 130-131 de la proteína. Particularmente, se caracterizó el efecto de la presencia de distintos aminoácidos en la inducción de los mecanismos de apoptosis y de autofagia y se analizaron las vías de transducción de señales de la apoptosis celular que podrían ser afectadas por las distintas variantes de HBV-X.

## 1. CLONADO DEL GEN X Y EXPRESIÓN EN CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO

Para estudiar la actividad biológica de las distintas variantes de HBV-X se estableció un sistema celular de hepatoma humano con expresión transiente de HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I.

Para el clonado del gen X se utilizaron muestras de pacientes con infección crónica B que presentaban las secuencias nucleotídicas salvaje y mutada en el gen X y correspondían a los subgenotipos más prevalentes del genotipo F en nuestro país (F1b y F4).

El genotipo F es el de mayor circulación en nuestro país, sin embargo hasta el momento poco se conoce acerca de las características biológicas de este particular genotipo. Algunos estudios han sugerido que la infección crónica B con el genotipo F está asociada con un curso más agresivo de la enfermedad hepática en comparación con los infectados por los genotipos A y D. Se observó un mayor daño histológico hepático (Pezzano et al., 2011), más riesgo de desarrollar HCC (Livingston et al., 2007; Osiowy et al., 2013) y una tasa de mortalidad asociada a enfermedades del hígado más alta en aquellos pacientes infectados con el genotipo F (Sánchez-Tapias et al., 2002). En relación con la respuesta al tratamiento, los datos publicados hasta el momento son escasos. Sin embargo se sugiere que las respuestas son aceptables y similares al tratamiento con interferón- $\alpha$ 2a pegilado en el genotipo F, en comparación con el genotipo A (Solari et al., 2009; Venegas et al., 2014).

La caracterización de la actividad biológica de HBV-X y de sus variantes, correspondientes a los subgenotipos F1b y F4 no había sido abordada hasta los estudios realizados por este grupo de trabajo (Barbini et al., 2005; Barbini y Campos, 2005; Barbini et al., 2008). Por consiguiente, resultaba necesario continuar ahondando en el estudio de los (sub)genotipos virales de circulación local, aportando más datos que puedan repercutir sobre la evolución de la infección y sobre el tratamiento de los pacientes de nuestra región geográfica.

Para la expresión de las variantes de HBV-X de ambos subgenotipos se seleccionaron tres líneas celulares de hepatoma humano: HepG2, Hep3B y Huh-7. Las mismas son líneas celulares establecidas derivadas de tumores hepáticos humanos de distintos orígenes. La línea HepG2 proviene del tejido hepático de un varón caucásico de 15 años de edad con hepatoblastoma. La línea Hep3B deriva de células de un carcinoma hepatocelular de un niño de raza negra de 8 años. Esta línea posee integrado parte del genoma del HBV en el genoma de la célula, expresa el antígeno de superficie del virus y

son deficientes en p53. La línea Huh-7 proviene de un tumor hepático de un hombre japonés de 57 años de edad. La utilización de líneas tumorales hepáticas de distinto origen permitió estudiar comparativamente las funciones de las HBV-X en diferentes estirpes celulares.

## 2. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR

Estudios previos realizados por este grupo de trabajo demostraron que la expresión de HBV-X del genotipo F inducía la muerte de hepatocitos humanos en cultivo (Barbini et al., 2005; Barbini y Campos, 2005). Por esta razón, en primera instancia se propuso evaluar el efecto de la expresión de las variantes de HBV-X sobre la viabilidad celular. Para ambos subgenotipos virales, la expresión de HBV-X salvaje y mutada indujo la muerte de los hepatocitos, evidenciado por la reducción en el número de células totales (Resultados, figuras 16 y 18) y el aumento de la mortalidad en las tres líneas celulares transfectadas (Resultados, figuras 17 y 19). Estos resultados confirman los previamente obtenidos por este grupo, pero en este caso para todas las variantes de la proteína analizadas y, asimismo, coinciden con los reportados por otros autores al expresar de manera transiente la proteína viral de otros genotipos en células HepG2 y Huh-7 (Kanda et al., 2004; Lin et al., 2005b).

Llamativamente, sólo en el caso de las células HepG2 se observaba que la expresión de HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I de los subgenotipos F1b y F4, además de aumentar el porcentaje de células muertas, también aumentaba el recuento del número total de células en cultivo, en relación con los controles (Resultados, figuras 16 y 18). Estos resultados se corroboraron al observar mediante microscopía de contraste de fases las células transfectadas, en las cuales se evidenciaba que la expresión de ambas HBV-X daba lugar a una mayor confluencia de las monocapas. Además se observaba un aumento marcado en la cantidad de células muertas, en comparación con las células control (Resultados, figuras 21 y 32).

Estudios previos han demostrado que, además de inducir la muerte de las células, HBV-X también puede activar la proliferación celular. La inducción de la proliferación ha sido descrita en sistemas en los cuales HBV-X se expresa en niveles “fisiológicos” en los hepatocitos, como por ejemplo cuando la expresión de la proteína es regulada por su propia secuencia promotora/*enhancer*, o cuando HBV-X se expresa en el contexto de la replicación del HBV (Gearhart y Bouchard, 2010; Huang et al., 2011). Una posible

hipótesis para explicar estos resultados es que la expresión de ambas HBV-X activa diferencialmente los mecanismos de muerte y de proliferación celular en la línea HepG2, dependiendo de los niveles de expresión de la proteína y de los distintos sistemas “*in vitro*” estudiados. Se propone que diferencias en los niveles de expresión de ambas HBV-X podrían conducir a que la misma active diferencialmente la proliferación o la muerte de las células. Por ejemplo, en aquellas células en las cuales HBV-X se expresa en niveles altos se induciría la muerte celular, mientras que en las células en las cuales HBV-X se expresa en niveles más bajos (“fisiológicos”) se induciría la proliferación.

Numerosos estudios han revelado que los niveles de expresión de HBV-X varían durante el curso de la infección por HBV, observándose que HBV-X muestra niveles bajos de expresión en las etapas tempranas. En cambio, altos niveles de la proteína se detectan en las etapas más avanzadas de la infección crónica (Arbuthnot et al., 2000; Murakami, 2001). Estas variaciones en la expresión de HBV-X podrían dar lugar a cambios en la actividad biológica de la proteína durante el curso de la infección por el HBV. Es posible que en las etapas tempranas de la infección, HBV-X active la proliferación celular para favorecer la replicación del virus y crear un reservorio de nuevos hepatocitos para propagar la infección viral, mientras que en estadíos más avanzados de la infección, el aumento de la expresión de HBV-X induzca la muerte de los hepatocitos infectados, contribuyendo a la progresión de la enfermedad hepática.

Estas diferencias en la actividad biológica de HBV-X también podrían estar asociadas con la localización subcelular de la proteína. Como se describió anteriormente, HBV-X es predominantemente nuclear cuando se expresa en las células en bajos niveles, pero se observa la traslocación hacia el citoplasma a medida que aumentan sus niveles de expresión. Es posible que dependiendo de su localización subcelular, HBV-X pueda regular distintos procesos biológicos. Sin embargo, hasta el momento no existen trabajos en los cuales se reporte esta dependencia de la localización en relación a sus actividades, luego de la expresión de HBV-X.

Además, se debe realizar una consideración acerca del sistema utilizado para los experimentos y las células empleadas en este trabajo de Tesis, que son líneas celulares transformadas. Una característica inherente de estas células es la modificación en los mecanismos normales de control de la proliferación y de la muerte celular y estas características podrían hacer que la actividad biológica de HBV-X fuera diferente en estas líneas celulares, en comparación a la actividad ejercida sobre hepatocitos normales. Por lo tanto, los resultados obtenidos deben interpretarse el contexto de líneas celulares

tumorales.

Por otro lado, el análisis de ambas variantes de HBV-X en las HepG2 reveló que para ambos subgenotipos el número total de células en el cultivo fue superior en las que expresaban HBV-X\_M/I respecto de las que expresaban HBV-X\_K/V (Resultados, figuras 16 y 18). Estos resultados indicarían una mayor estimulación de la proliferación celular en las células que expresan HBV-X mutada en relación a las que expresan HBV-X salvaje.

Varios autores han propuesto que uno de los mecanismos por los cuales HBV-X promueve la proliferación, es la desregulación de ciclo celular (Kwun y Jang, 2004; Calvisi et al., 2009). La progresión del ciclo celular está regulada por ciclinas dependientes de quinasas y sus inhibidores específicos (Sherr y Roberts, 1999). La proteína p21 es un inhibidor universal de las ciclinas dependientes de quinasas, que bloquea el pasaje de la fase G1 a la fase S. Se ha demostrado que HBV-X puede disminuir los niveles de p21, acelerando la progresión del ciclo celular y estimulando la proliferación celular. Además, se probó que ciertas mutaciones en HBV-X, entre ellas las del BCP, provocan una disminución mayor en los niveles de p21, y por lo tanto una mayor estimulación de la proliferación celular (Huang et al., 2011; Huang et al., 2013). En base a estos antecedentes, se podría explicar el aumento mayor en la proliferación de los hepatocitos observado en las células que expresan HBV-X mutada.

Cabe aclarar que en este trabajo de Tesis se estudiaron los mecanismos de muerte que son modulados por ambas variantes de HBV-X. Sin embargo, futuros estudios se focalizarán en confirmar la inducción de la proliferación en las HepG2 que expresan HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I y caracterizar los mecanismos por los cuales la HBV-X promueve la proliferación celular.

### **3. HBV-X\_K/V Y HBV-X\_M/I INDUCEN LA APOPTOSIS**

Estudios previos han mostrado resultados contradictorios en relación al efecto de HBV-X sobre la apoptosis. Se ha reportado que HBV-X es capaz de inducir (Chirillo et al., 1997; Su y Schneider, 1997; Kim et al., 1998; Bergametti et al., 1999; Kim y Seong, 2003; Miao et al., 2006; Kim et al., 2008), inhibir (Lee et al., 2001b; Diao et al., 2001; Pan et al., 2001), sensibilizar (Su y Schneider, 1997; Wang et al., 2004), o no tener ningún efecto sobre el mecanismo de apoptosis (Madden et al., 2000; Yun et al., 2002). Se postula que estas actividades aparentemente discrepantes reflejan diferencias en los tipos celulares analizados (células primarias, transgénicas, inmortales o tumorales) y en los sistemas

experimentales utilizados en estos diferentes ensayos (transfección estable, transfección transiente o ratones transgénicos).

Además, existen evidencias que sugieren que los niveles de expresión de HBV-X también son importantes en los efectos que puede producir esta proteína. Como se mencionó anteriormente, se ha observado que HBV-X presenta muy bajos niveles de expresión en las etapas tempranas de la infección por el HBV, lo que contribuiría a la activación transcripcional y a la replicación viral. De manera consecuente con el desarrollo de la infección crónica se produce un marcado aumento en la expresión de HBV-X, y elevados niveles de la proteína se detectan en la mayoría de los casos de cirrosis y en los tumores primarios (Sirma et al., 1999; Arbuthnot et al., 2000; Murakami, 2001). Es posible que HBV-X inhiba la apoptosis en las etapas tempranas de la infección para facilitar la replicación del HBV en los hepatocitos infectados y, posteriormente, active la apoptosis para contribuir a la diseminación del virus. El aumento en la tasa de muerte de los hepatocitos infectados eleva la producción de factores de crecimiento en el hígado, lo que aumenta la regeneración hepática y crea un reservorio de nuevos hepatocitos no infectados para propagar la infección viral. Los efectos discordantes de HBV-X en la apoptosis podrían reflejar efectos dependientes de la concentración opuestos en las diferentes etapas de la historia natural de la infección por HBV. No obstante, tanto la estimulación como la inhibición de la apoptosis podrían conducir a la transformación maligna de los hepatocitos. La inhibición de la vía apoptótica favorecería la acumulación de mutaciones potencialmente transformantes en los hepatocitos, en tanto que el aumento de la proliferación compensatoria en respuesta a los estímulos pro-apoptóticos conduciría a la selección de células hepáticas premalignas y al posterior desarrollo de HCC (Sirma et al., 1999; Arbuthnot et al., 2000; Murakami, 2001). Además, el efecto pro-apoptótico de HBV-X en los hepatocitos se cree que también podría facilitar la evasión de la respuesta inmune celular del hospedador durante la infección crónica, posiblemente a través del aumento en la expresión de FasL, con el consecuente aumento en la apoptosis de las células T infiltradas que expresan Fas.

En este trabajo de Tesis se ha demostrado que la expresión de HBV-X salvaje y mutada de los subgenotipos F1b y F4 induce la apoptosis en las líneas de hepatoma analizadas. En las células transfectadas con HBV-X\_K/V y HBV-X\_MI de ambos subgenotipos se detectó inducción de la apoptosis por distintas metodologías, en relación a los controles (Resultados, figuras 21-42). Estos resultados son coincidentes con los reportados por diversos autores al expresar de manera transiente la proteína viral en

células HepG2 (Lin et al., 2005b; Tang et al., 2012), Hep3B (Miao et al., 2006) y Huh-7 (Kanda et al., 2004).

En la infección por el HBV el daño hepático es causado principalmente por la respuesta inmune del hospedador, a través del reconocimiento de los antígenos virales expresados en la superficie del hepatocito por los LTc CD8+ específicos, con la consiguiente inducción de la apoptosis de las células infectadas. Sin embargo, como se ha demostrado en este trabajo, la capacidad de HBV-X salvaje y mutada de los subgenotipos F1b y F4 de inducir la apoptosis en los hepatocitos, conduce a proponer un rol para ambas proteínas en el daño hepático de la infección crónica por HBV, contribuyendo en la patogenia de la infección y en el desarrollo de HCC en los pacientes infectados crónicos.

No obstante los numerosos trabajos que analizan el efecto de la expresión de HBV-X sobre la modulación de la apoptosis, hasta el momento poco se conoce acerca del impacto que las mutaciones en HBV-X o que los distintos genotipos virales tendrían sobre la actividad biológica de esta proteína. El único estudio que analizó estas variables fue realizado por Kanda y colaboradores (2004), quienes evaluaron si los genotipos virales A, B y C y las mutaciones en el BCP afectaban la inducción de la apoptosis por HBV-X en células Huh-7. El análisis de la apoptosis no mostró diferencias en la actividad pro-apoptótica de HBV-X, en relación a los distintos genotipos y a las distintas variantes de HBV-X.

Sin embargo, en este trabajo de Tesis de las tres líneas celulares analizadas, fue en la línea Huh-7 en la que se evidenciaron diferencias significativas en la apoptosis inducida por ambas variantes de HBV-X. Si bien los ensayos de observación morfológica y de fragmentación del ADN genómico no mostraron diferencias en la apoptosis inducida por ambas variantes de la proteína, la cuantificación de las células en apoptosis teñidas con naranja de acridina y bromuro de etidio reveló un aumento significativo en el porcentaje de apoptosis en las células que expresaban HBV-X salvaje, respecto de las que expresaban HBV-X mutada para los dos subgenotipos virales (Resultados, figuras 31 y 42). Estos resultados sugieren que en la línea Huh-7 la expresión de HBV-X salvaje tendría un mayor efecto sobre la inducción de la apoptosis que la proteína mutada.

Las diferencias observadas en ambos trabajos podrían estar asociadas a los sistemas experimentales utilizados y a los niveles de expresión de las variantes de HBV-X alcanzados en ambos sistemas. Además, se debe considerar que en ambos trabajos se analizaron genotipos diferentes y los métodos empleados para detectar apoptosis se



basaban en diferentes características del proceso apoptótico.

Por otro lado, la comparación de las células en apoptosis temprana y tardía entre los subgenotipos F1b y F4 reveló un mayor porcentaje de apoptosis en las células que expresaban la proteína mutada del subgenotipo F1b, en relación a las que expresaban HBV-X\_M/I del subgenotipo F4 (Resultados, figura 43). Estos resultados sugieren que el subgenotipo F1b tendría un mayor efecto sobre la inducción del proceso de apoptosis, respecto del subgenotipo F4. Asimismo, los resultados coinciden con los observados al comparar la mortalidad de las células transfectadas con ambos subgenotipos (Resultados, figura 20). Por consiguiente, estos hallazgos revelarían diferencias en la actividad biológica de las HBV-X pertenecientes a los subgenotipos F1b y F4, en relación a la modulación de la apoptosis. Estas variaciones en los niveles de apoptosis podrían dar lugar a diferencias en la evolución de la infección crónica de los pacientes infectados con los subgenotipos F1b y F4, al menos en las etapas avanzadas de la infección, en las cuales las mutaciones en el BCP se observan con mayor frecuencia. La mayor inducción de la apoptosis en los pacientes con infección con el subgenotipo F1b podría aumentar el daño hepático y acelerar el desarrollo de la enfermedad hepática severa (cirrosis y HCC), en relación a los pacientes infectados con el subgenotipo F4.

El gen supresor de tumores p53 es un factor central en el mantenimiento de la integridad genómica, el cual actúa mediante el control de las repuestas celulares a distintos tipos de estrés (Bressac et al., 1991). Una de las principales respuestas celulares a la activación de p53 es la inducción de la apoptosis. El aumento en la expresión de p53 conduce a la expresión de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2, como Bax, Noxa y PUMA, las cuales desencadenan el proceso apoptótico (Vousden y Lane, 2007). Varios estudios han demostrado que HBV-X puede interaccionar con el gen p53 inhibiendo su función apoptótica, como así también inducir la apoptosis de hepatocitos mediante la vía dependiente de p53 (Wang et al., 1994; Truant et al., 1995).

Las líneas celulares de hepatoma utilizadas en este trabajo se caracterizan por presentar distintos fenotipos de la proteína supresora de tumores p53. Las HepG2 expresan la proteína p53 salvaje, las Hep3B poseen el gen p53 parcialmente deletado y no expresan a esta proteína, y las Huh-7 presentan una forma mutada del gen p53, que se expresa en mayores niveles y posee una mayor vida media que la proteína salvaje, lo que conduce a su acumulación en el núcleo celular (Bressac et al., 1990).

En este trabajo de Tesis la expresión de HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I de los subgenotipos F1b y F4 indujo la apoptosis de las tres líneas celulares estudiadas. La

observación de que ambas HBV-X tengan la capacidad de inducir la apoptosis en células con diferentes fenotipos respecto de la proteína p53, sugiere que las formas salvaje y mutada de HBV-X son capaces de desencadenar el proceso apoptótico, independientemente del fenotipo de p53 de cada línea celular.

#### **4. HBV-X\_K/V Y HBV-X\_M/I REGULAN LA EXPRESIÓN DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS DE BCL-2**

El mecanismo de apoptosis puede ser activado por una gran variedad de estímulos, tanto extra e intracelulares, los cuales disparan dos vías principales de señalización apoptótica: la vía extrínseca o de receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial. La vía apoptótica mitocondrial es regulada por la familia de proteínas de Bcl-2, la cual incluye tanto miembros pro-apoptóticos (Bax) como anti-apoptóticos (Bcl-2 y Bcl-X). Varios estudios han demostrado que HBV-X puede regular el mecanismo de apoptosis a través de la modulación de la expresión de las proteínas pertenecientes a esta familia (Miao et al., 2005; Kuo et al., 2008; Geng et al., 2012; Yang y Cho, 2013). Sin embargo, no existen estudios que analicen si las HBV-X con cambios en 130-131 tienen la capacidad de modular diferencialmente los niveles de expresión de estas proteínas.

En este trabajo de Tesis se demostró que HBV-X salvaje y mutada de los subgenotipos F1b y F4 modulan diferencialmente la expresión de las proteínas pro (Bax) y anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-X) de la vía mitocondrial (Resultados, figuras 44-55). Estos hallazgos confirman la participación de esta vía apoptótica en la apoptosis inducida por ambas proteínas virales. Adicionalmente, no se evidenciaron diferencias en la expresión de las proteínas pro y anti-apoptóticas cuando se realizó la comparación entre los efectos de ambas variantes de HBV-X dentro del mismo subgenotipo, lo que indicaría que HBV-X\_K/V y HBV\_M/I del mismo subgenotipo (F1b y F4) modulan de manera similar a las proteínas Bcl-2.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis demuestran que ambas HBV-X disminuyen la expresión de la proteína pro-apoptótica (Bax) y aumentan los niveles de la proteína anti-apoptótica (Bcl-X), aunque la respuesta final es la inducción de la apoptosis en las tres líneas celulares de hepatoma. Cabe mencionar que las proteínas de la familia de Bcl-2 incluyen numerosos miembros pro y anti-apoptóticos y la inducción de la muerte celular por apoptosis depende del balance final que resulta de la expresión de todas las proteínas miembros de la familia (pro y anti-apoptóticas) que participan en esta vía de

señalización. Además, la actividad de las proteínas de la familia de Bcl-2 depende no sólo de su abundancia, sino también de su localización subcelular, de sus modificaciones post-traduccionales y de sus proteínas interactuantes. Es por esta razón, que los resultados aquí presentados reflejan sólo lo que sucede con una pequeña fracción de la compleja red de interacciones que existen entre las proteínas de la familia de Bcl-2. Asimismo, se debe considerar que las proteínas de la familia de Bcl-2 no son los únicos reguladores del proceso apoptótico y que otras vías regulatorias *downstream*, como por ejemplo la regulación mediante los inhibidores de las caspasas, podrían ser activadas de manera diferencial por las distintas formas de HBV-X.

Varios estudios han demostrado que además de encontrarse en el citoplasma y en el núcleo de los hepatocitos, HBV-X también se localiza en la mitocondria (Takada et al., 1999; Henkler et al., 2001). Se ha probado que la HBV-X mitocondrial tiene la capacidad de interactuar con el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC3) ubicado en la membrana mitocondrial externa y alterar el potencial de membrana mitocondrial (Rahmani et al., 2000). Se sabe que las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X interactúan con el VDAC3 impidiendo la liberación del citocromo c que desencadena el proceso apoptótico. Sin embargo, se postula que la interacción VDAC3-HBV-X podría provocar cambios conformacionales que eviten la modulación de la actividad de este canal por las proteínas anti-apoptóticas, ocasionando la despolarización de la membrana mitocondrial, la liberación del citocromo c y la inducción de la apoptosis. Esta hipótesis es apoyada por Terradillos y colaboradores (2002) quienes demostraron que HBV-X puede inducir la apoptosis en ratones transgénicos que sobre-expresaban a la proteína Bcl-2. Los resultados obtenidos en estos trabajos podrían explicar en parte la inducción de la apoptosis producida por HBV-X en las tres líneas celulares analizadas, a pesar del aumento en los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-X.

La proteína pro-apoptótica Bax se localiza en el citoplasma celular, pero ante un estímulo apoptótico se transloca hacia la mitocondria, en donde provoca la permeabilización de la membrana externa mitocondrial mediante la apertura del MPTP (Kroemer et al., 2008). Estudios realizados por Kim y colaboradores (2008) demostraron que HBV-X puede inducir la apoptosis de células HepG2, interactuando con Bax en el citoplasma y aumentando su translocación hacia la mitocondria. En este Trabajo de Tesis los niveles de expresión de Bax se analizaron en extractos de proteínas totales. Sin embargo, es posible que la activación de la apoptosis en las tres líneas celulares

transfectadas sea consecuencia del aumento de los niveles en la fracción mitocondrial de esta proteína, provocados por un cambio en su localización subcelular.

En consecuencia, estos trabajos de investigación demuestran que HBV-X puede inducir la apoptosis no sólo modulando la cantidad de las proteínas de la familia de Bcl-2, sino que además podría modular la actividad de estas proteínas a través de la modificación de sus proteínas interactuantes y de su localización subcelular. Futuros estudios se focalizarán en evaluar los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax en distintas fracciones subcelulares (citoplasma y mitocondria) de células transfectadas con HBV-X salvaje y mutada de ambos subgenotipos.

Adicionalmente, la comparación de los niveles de expresión de las proteínas de esta familia entre los subgenotipos F1b y F4 reveló diferencias en los niveles de la proteína Bcl-2, los cuales resultaron mayores en las HepG2 que expresaban ambas HBV-X del subgenotipo F1b, en relación a las que expresaban las proteínas del subgenotipo F4 (Resultados, figura 57). Estos resultados sugieren una modulación diferencial sobre la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en las HepG2 entre ambos subgenotipos de HBV-X.

Por otro lado, existen evidencias que demuestran que además de activar la vía apoptótica mitocondrial, HBV-X puede inducir la apoptosis a través de la activación de la vía extrínseca, mediante la sobre-regulación de proteínas relacionadas a la vía de señalización de Fas/FasL, y el aumento de la actividad de caspasa-8 (Tang et al., 2012; He et al., 2013). Kuo y colaboradores (2012) demostraron que la expresión de HBV-X en células Chang induce la apoptosis a través de la activación simultánea de las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca, mediante el aumento en la expresión de proteínas pro-apoptóticas (Bax y Bad), de la liberación de citocromo c y de los niveles de caspasas 9 (vía intrínseca) y 8 (vía extrínseca) clivadas. En este trabajo de Tesis se demostró que en la línea Huh-7 el porcentaje de apoptosis resultó mayor en las células que expresaban HBV-X salvaje de ambos subgenotipos, respecto de las que expresaban la proteína mutada (Resultados, figuras 31 y 42). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias en la expresión de las proteínas anti y pro-apoptóticas entre ambas HBV-X de los dos subgenotipos en esta línea celular (Resultados, figuras 44-55). Es posible que en las Huh-7, HBV-X active adicionalmente la vía apoptótica extrínseca, y las diferencias observadas en la estimulación de la apoptosis sean consecuencia de variaciones en los niveles de inducción de esta vía entre las dos formas de la proteína viral. Futuros estudios se focalizarán en evaluar si la expresión de HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I de ambos

subgenotipos induce adicionalmente la apoptosis a través de la activación de la vía extrínseca, mediante el estudio de la actividad de caspasa-8.

Por consiguiente, los resultados obtenidos en esta Tesis demuestran que HBV-X salvaje y mutada tiene la capacidad de modular la expresión de las proteínas de la familia de Bcl-2, sin embargo sólo el estudio de los niveles de expresión de estas proteínas no es suficiente para esclarecer totalmente la acción pro-apoptótica observada luego de la expresión de ambas proteínas virales en las líneas celulares estudiadas.

## **5. HBV-X\_K/V Y HBV-X\_M/I INDUCEN LA AUTOFAGIA**

El proceso de autofagia, a través de la auto-degradación de componentes celulares, provee de nutrientes para mantener las funciones celulares vitales durante los procesos de escasez de nutrientes y, además, remueve organelas dañadas y patógenos intracelulares (Levine and Kroemer, 2008). Sin embargo, numerosos virus han desarrollado estrategias que les posibilitan evadir la degradación autofágica y que les permiten utilizar ciertos aspectos del proceso autofágico para su propio beneficio (Kudchodkar and Levine, 2009).

Una característica del proceso de autofagia es su regulación dinámica. La actividad autofágica es usualmente baja en condiciones normales, pero puede aumentar significativamente en respuesta a numerosos estímulos, como la replicación viral o la producción de ciertas proteínas virales (Mizushima et al., 2010). Dado que el autofagosoma es una estructura intermedia dentro de un proceso dinámico, el número de autofagosomas observado en un momento determinado depende del balance entre la tasa de su generación y la tasa de su conversión en autolisosomas. Por consiguiente, la acumulación de autofagosomas puede representar tanto la inducción de la autofagia como la inhibición de la vía en un paso posterior a la formación del autofagosoma.

En este trabajo de Tesis la observación mediante microscopía electrónica de transmisión de las células con expresión de HBV-X salvaje y mutada de los subgenotipos F1b y F4, reveló un aumento en el número de vacuolas autofágicas, tanto de autofagosomas como de autolisosomas, en comparación con las células control (Resultados, figuras 59-64). Estos resultados demuestran la capacidad de HBV-X de modular el proceso de autofagia en las tres líneas de hepatoma analizadas. El hecho de que se observara un aumento tanto del número de autofagosomas como de autolisosomas confirma que las dos formas de HBV-X inducen la autofagia en las células

estudiadas. Adicionalmente, no se observaron diferencias en el tipo ni en el número de vacuolas autofágicas en las células que expresaban HBV-X salvaje y mutada de ambos subgenotipos, lo que indicaría que ambas variantes modulan de manera similar el proceso. Cabe resaltar que este trabajo de Tesis es el primero en demostrar la capacidad de HBV-X con mutaciones en 130-131, en particular del genotipo F, de inducir la autofagia en hepatocitos humanos.

El estudio de la participación de HBV-X en la vía autofágica también ha mostrado resultados dispares de distintos autores. Sir y colaboradores (2010) demostraron que HBV induce la autofagia en células en cultivo, en el hígado de ratones transgénicos, así como también durante la infección natural. Estos autores propusieron que el aumento de la autofagia estaría mediado por HBV-X, mediante su unión a la PI3K de clase III, Vps34 y su posterior activación. Sin embargo, en este trabajo, el aumento en la cantidad de vacuolas autofágicas no se correlacionó con un aumento en la tasa de degradación de proteínas mediada por la autofagia. Tang y colaboradores (2009) propusieron que HBV-X puede aumentar la autofagia inducida por la privación de nutrientes mediante el aumento de la actividad del promotor de Beclina-1. Trabajos más recientes también han demostrado la inducción de la autofagia mediada por HBV-X a través de la regulación de la vía PI3K/Akt-mTOR y mediante la activación de la proteína quinasa DAPK en células HepG2 y Chang, respectivamente (Wang et al., 2013; Zhang et al., 2014). Por el contrario, un estudio realizado por Liu y colaboradores (2014) mostró que la expresión de HBV-X en células Huh-7 aumentaba la cantidad de vacuolas autofágicas (autofagosomas y autolisosomas), pero también los niveles de proteínas que comúnmente son degradadas por esta vía, como LC3 y p62. Por lo tanto, estos autores propusieron que, en lugar de inducir la autofagia, HBV-X estaría inhibiendo este proceso. Mediante distintos ensayos demostraron que la expresión de HBV-X inhibe la acidificación lisosomal, sin perturbar la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, lo que daría lugar a la acumulación de las vacuolas autofágicas y de las proteínas usualmente degradadas mediante la autofagia.

En base a estos resultados se propone que el HBV tendría un doble efecto sobre la regulación de la vía autofágica, induciéndola o inhibiéndola en distintas etapas. Por un lado, induciría la autofagia para aumentar la replicación del ADN viral. En este sentido, varios estudios han demostrado que la inducción de los autofagosomas contribuye a la producción de progenie viral, y la inhibición en la formación de estas estructuras reprime la replicación viral (Dreux et al., 2009; Sir et al., 2010; Tian et al., 2011). Además, el aumento en la cantidad de autofagosomas jugaría un rol fundamental en la adquisición de

la envoltura del virus lo que apoya la idea de que las membranas derivadas de los autofagosomas pueden ser utilizadas como una fuente de membranas para la envoltura viral (Li et al., 2011). Por otro lado, es posible que el HBV también inhiba el proceso autofágico en etapas tardías de la vía autofágica, inhibiendo la actividad lisosomal, lo que le posibilitaría escapar de la destrucción directa y de esa manera evitar la generación de péptidos antigénicos y/o atenuar la presentación antigénica (Tardif y Siddiqui, 2003; Taguwa et al., 2011).

La continua activación de la autofagia en los hepatocitos de los pacientes infectados crónicos podría jugar un rol importante en la patogénesis del HBV, aumentando la producción de viriones y manteniendo la viabilidad de células que deberían morir. Además, cada vez más evidencias sugieren que defectos en la autofagia estarían asociados con el desarrollo del cáncer. Se ha demostrado que la acumulación de la proteína selectivamente degradada por autofagia p62, ya sea por la pérdida de genes esenciales para la autofagia o por la inhibición en la función lisosomal, puede contribuir al desarrollo del HCC. Existen evidencias que demuestran que el exceso de p62 lleva a la formación de agregados que provocan daños en el ADN y estimulan una respuesta inflamatoria pro-tumorigénica (Duran et al., 2008; Mathew et al., 2009; Ling et al., 2012). Además, la activación persistente del factor nuclear NFE2L2/Nrf2 por la acumulación de p62 ha asociado la deficiencia en la autofagia con el desarrollo de tumores hepáticos (Hayes y McMahon, 2012). Por consiguiente, la activación de la autofagia para aumentar la replicación viral, así como la inhibición de la actividad lisosomal provocados por HBV-X desempeñarían un rol en la patogénesis del HBV, contribuyendo al desarrollo de la enfermedad hepática y HCC.

El análisis de la secuencia aminoacídica de HBV-X llevada a cabo por Lu y Chen (2005) reveló la existencia de un dominio de homología a Bcl-2 del tipo BH3, localizado entre los aminoácidos 116 y 130 de la proteína viral. La región conservada BH3 está presente en todas las proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2, y es de crítica importancia para muchas de las proteínas pro-apoptóticas de esta familia, ya que este motivo media su interacción con las proteínas anti-apoptóticas, neutralizando la habilidad de las mismas de prolongar la viabilidad celular y desencadenando la muerte celular por apoptosis (Kelekar y Thomson, 1998). Además de los miembros de la familia de Bcl-2, la proteína autofágica Beclina-1 también posee un dominio del tipo BH3 que le permite interactuar con las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X. La unión de cualquiera de las proteínas anti-apoptóticas a Beclina-1 impide la unión de esta proteína con la PI3K de

clase III Vps34, inhibiendo la vía autofágica (Patingre et al., 2005). El estudio de interacción de HBV-X con las diferentes proteínas de la familia de Bcl-2 reveló que la proteína viral interacciona selectivamente con los miembros anti-apoptóticos de esta familia de proteínas, pero no con sus miembros pro-apoptóticos (Lu y Chen, 2005; Geng et al., 2012). La capacidad de HBV-X de unirse selectivamente a las proteínas Bcl-2 y Bcl-X podría explicar algunas de las funciones atribuidas a esta proteína. La HBV-X actuaría como una proteína del grupo de las “BH3-*only*” interaccionando e inactivando a Bcl-2 y Bcl-X, lo que llevaría a la activación de los procesos de apoptosis y de autofagia, tal como se demuestra en este trabajo de Tesis. Además, como ambas variantes de la proteína estudiadas en este trabajo resultaron capaces de inducir estos dos mecanismos, se puede suponer que las mutaciones en los aminoácidos 130-131, que incluyen parcialmente a la región BH3, no afectarían la capacidad de HBV-X de interaccionar e inactivar a las proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2.

Las mitocondrias son organelas cruciales para la producción de energía, la regulación de la señalización celular y la amplificación de la apoptosis. Esta versatilidad funcional está asociada a su variabilidad morfológica y estructural (Bereiter-Hahn y Voth, 1994). Entre los experimentos de esta Tesis, la observación por microscopía electrónica de las células que expresaban HBV-X salvaje y mutada de ambos subgenotipos en las tres líneas celulares reveló cambios morfológicos en las mitocondrias, respecto de las células control. En general, las mitocondrias presentaban forma más alargada y con crestas más visibles y desorganizadas (Resultados, figuras 59-64). Alteraciones similares en la morfología mitocondrial fueron descritas por Gomes y colaboradores (2011), quienes demostraron que durante la autofagia inducida por la privación de nutrientes las mitocondrias se alargan, siendo este proceso un componente crítico de la respuesta celular a la autofagia. Además evidenciaron que estas mitocondrias alargadas estaban protegidas de la eliminación autofágica y que poseían una mayor densidad de crestas, lo que asociaban a un aumento en la eficiencia en la producción de ATP para mantener la viabilidad celular. La morfología similar entre las mitocondrias observadas en esta Tesis y las detectadas por estos investigadores aporta a la confirmación de la inducción de la autofagia en las células que expresaban HBV-X. Por otro lado, las células HepG2 que expresaban la HBV-X salvaje mostraron mitocondrias de gran tamaño, mucho mayores que las mitocondrias de las células control para esa línea celular (Resultados, figuras 59 y 62). Es posible que este aumento en el tamaño de las mitocondrias esté asociado con un aumento en la cantidad y densidad de crestas mitocondriales para aumentar la producción



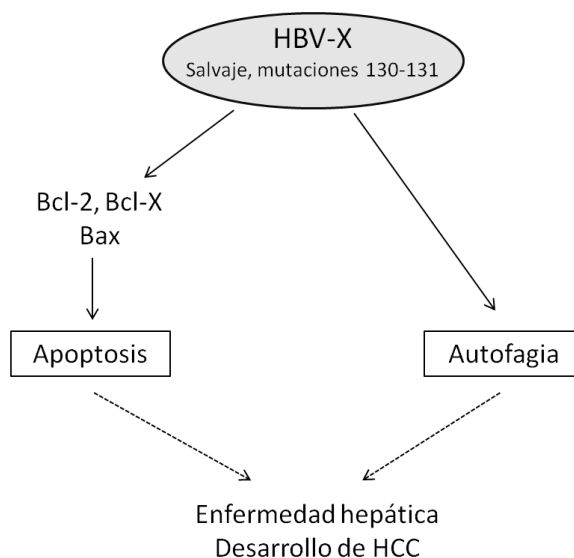
de ATP, y así mantener la viabilidad de la célula durante el proceso autofágico.

Además de la detección de vacuolas autofágicas por microscopía electrónica, otro de los métodos más utilizados para estudiar el proceso autofágico es el análisis de la conversión de la proteína LC3 de su forma citosólica (LC3-I) a su forma lipidada y asociada a los autofagosomas (LC3-II), mediante *Western Blot*. Sin embargo en los experimentos de este trabajo de Tesis, sólo pudo detectarse a LC3-I, de las dos formas existentes de la proteína (LC3-I de 18 KDa y LC3-II de 16 KDa). La forma citoplasmática de LC3 mostró una disminución en sus niveles de expresión en las células que expresaban HBV-X salvaje y mutada respecto de las células control, lo que sería compatible con la formación de LC3-II asociada a los autofagosomas (Resultados, figuras 65-66).

Dadas las dificultades experimentales que se tuvieron en estos ensayos, en este marco, se debe tener en cuenta que los *Western Blots* para estudiar la conversión de LC3 son problemáticos. Por un lado, LC3 es una proteína lábil, muy sensible a los procesos sucesivos de congelado-descongelado y a la degradación en el *buffer* de siembra que contiene SDS. Además, LC3-II al ser una proteína hidrofóbica puede no solubilizarse correctamente en el detergente utilizado para la extracción de las proteínas totales del cultivo celular (Tanida et al., 2008). Por otro lado, LC3 se expresa en células de mamíferos en 4 isoformas (LC3A, LC3B, LC3B2 y LC3C) que exhiben diferentes distribuciones en los tejidos. Es posible que la forma presente en los hepatocitos no sea la isoforma más comúnmente detectada por los anticuerpos empleados. Por ejemplo, los anticuerpos comerciales anti-LC3B también reconocen LC3A, pero no reconocen a LC3C, la cual comparte menor homología de secuencia (Klionsky et al., 2012). También es posible que la ausencia de LC3-II se deba a un intenso flujo autofágico que degrade rápidamente a esta proteína impidiendo su detección mediante inmunoblots. Por consiguiente, se debe tener precaución para la correcta detección e interpretación de los *Western Blots* para LC3.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis demuestran que la expresión de HBV-X salvaje y mutada de los subgenotipos de mayor circulación en el país (F1b y F4), inducen los procesos de apoptosis y de autofagia en células de hepatoma humano. La activación de la apoptosis en las tres líneas celulares está mediada, al menos en parte, por la modulación de los niveles de expresión de las proteínas pro (Bax) y anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-X) de la familia de Bcl-2. Esto demuestra la participación de la vía apoptótica mitocondrial en la apoptosis inducida por las dos variantes de HBV-X. La prolongada inducción de los procesos de apoptosis y de autofagia en los hepatocitos que expresan ambas variantes de HBV-X jugaría un importante rol en la patogenia de la infección por HBV, contribuyendo al desarrollo de enfermedad hepática severa y de HCC en los pacientes infectados crónicos.

El modelo propuesto de la actividad biológica de HBV-X salvaje y mutada se muestra en la figura 67.



**Figura 67.** Modelo propuesto de la actividad biológica de HBV-X salvaje y mutada de los subgenotipos F1b y F4 en las tres líneas celulares.

En este trabajo de Tesis la actividad de ambas variantes de HBV-X se estudió sobre-expresando únicamente la proteína viral en líneas celulares ya transformadas. Sin embargo, se ha sugerido que la sobre-expresión de la proteína puede llevar a la

formación de agregados o alterar su localización subcelular, modificando en última instancia su actividad biológica. Es por esta razón que en futuros estudios se propone validar el sistema propuesto evaluando la actividad biológica de HBV-X salvaje y mutada en el contexto de la replicación del virus en hepatocitos primarios, el cual representa un modelo biológicamente más apropiado para estudiar el efecto de ambas proteínas sobre los procesos de proliferación y de muerte celular.

Aunque los mecanismos precisos de patogenia del HBV no se comprenden completamente, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis aportan a la descripción de los mecanismos moleculares mediante los cuales distintas variantes de HBV-X contribuyen a la patogenia en el hígado infectado. Además, los resultados aquí presentados contribuyen a la caracterización biológica del genotipo F, autóctono latinoamericano, responsable de la mayoría de las infecciones por el HBV en nuestra región.

# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1. La expresión de la HBV-X salvaje y mutada de los subgenotipos F1b y F4 produce una disminución en la viabilidad y un aumento en la mortalidad de las tres líneas de hepatoma humano estudiadas. En las Hep3B y Huh-7, la expresión de HBV-X\_K/V y HBV-X\_M/I disminuye el número de células totales y aumenta el número de células muertas. En las HepG2, la expresión de ambas HBV-X conduce tanto al aumento en el número de células totales como al aumento en la mortalidad.
2. La expresión transiente de ambas variantes de HBV-X de los subgenotipos F1b y F4 induce la apoptosis en las tres líneas celulares analizadas, demostrada por distintas metodologías. En las Huh-7, la expresión de HBV-X salvaje de ambos subgenotipos tendría un efecto mayor sobre la inducción de la apoptosis que la proteína mutada.
3. La HBV-X salvaje y mutada de los subgenotipos F1b y F4 modula diferencialmente la expresión de las proteínas pro (Bax) y anti-apoptóticas (Bcl-X y Bcl-2) de la familia de proteínas de Bcl-2 en las tres líneas celulares estudiadas. Los resultados demuestran la participación de la vía apoptótica mitocondrial en la apoptosis inducida por las dos variantes de HBV-X.
4. La expresión de HBV-X salvaje y mutada de los subgenotipos F1b y F4 induce la autofagia en las tres líneas de hepatoma humano, demostrada por varias metodologías.

# BIBLIOGRAFÍA



**BIBLIOGRAFÍA**

- Ahn J.Y., Chung E.Y., Kwun H.J. y Jang K.L. 2001. Transcriptional repression of p21 (waf1) promoter by hepatitis B virus X protein via a p53-independent pathway. *Gene*. 275: 163–168.
- Amini-Bavil-Olyae S., Herbers U., Sheldon J., Luedde T., Trautwein C. y Tacke F. 2009. The rtA194T polymerase mutation impacts viral replication and susceptibility to tenofovir in hepatitis B e antigen-positive and hepatitis B e antigen-negative hepatitis B virus strains. *Hepatology*. 49: 1158–1165.
- Andrisani O.M. y Barnabas S. 1999. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis. *Int J Onc*. 15: 373–379.
- Arauz-Ruiz P., Norder H., Visoná K.A. y Magnius L.O. 1997. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small S gene. *J Infect Dis*. 176: 851–858.
- Arauz-Ruiz P., Norder H., Robertson B.H. y Magnius L.O. 2002. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol*. 83: 2059–2073.
- Arbuthnot P., Capovilla A. y Kew M. 2000. Putative role of hepatitis virus X protein in hepatocarcinogenesis: effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. *J Gastroenterol Hepatol*. 15: 357-368.
- Arzberger S., Hosel M. y Protzer U. 2010. Apoptosis of hepatitis B virus-infected hepatocytes prevents release of infectious virus. *J Virol*. 84: 11994–12001.
- Ashkenazi A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*. 2: 420-430.
- Baptista M., Kramvis A. y Kew M.C. 1999. High prevalence of 1762(T) 1764(A) mutations in the basic core promoter of hepatitis B virus isolated from black Africans with hepatocellular carcinoma compared with asymptomatic carriers. *Hepatology*. 29: 946–953.
- Barbini L., García G., Taboga O., Tadey L., Carrillo E. y Campos R. 2005. La proteína X del virus de la hepatitis B genotipo F induce la muerte de hepatocitos humanos. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana* 35, página 69. XIII Congreso Argentino de Hepatología. 10 al 13 de junio de 2005. Buenos Aires. Argentina.
- Barbini L. y Campos R. 2005. Estudio comparativo de la actividad biológica de la proteína X del virus de la hepatitis B de distintos genotipos. *Revista Argentina de*

- Microbiología 37, página 95. VIII Congreso Argentino de Virología. 19 al 22 de septiembre de 2005. Buenos Aires. Argentina.
- Barbini L., Cardoso F. y Campos R. 2008. Vías intracelulares involucradas en la apoptosis de hepatocitos inducida por la proteína X del virus de la hepatitis B genotipo F. Revista Argentina de Microbiología Supl. 1: página 42. IX Congreso Argentino de Virología (SAV, AAM), Buenos Aires, Argentina. 22-25 de septiembre de 2008.
- Barbini L., Elizalde M., Torres C. y Campos R. 2013. Molecular epidemiology and genetic diversity of hepatitis B virus in Mar del Plata city, Argentina. Infect Genet Evol. 19: 152-163.
- Bartenschlager R. y Schaller H. 1992. Hepadnaviral assembly is initiated by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. EMBO J. 11: 3413-3420.
- Belov G.A., Altan-Bonnet N., Kovtunovych G., Jackson C.L., Lippincott-Schwartz J. y Ehrenfeld E. 2007. Hijacking components of the cellular secretory pathway for replication of poliovirus RNA. J Virol. 81: 558-567.
- Benn J. y Schneider R.J. 1994. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. Proc Natl Acad Sci U S A. 91: 10350–10354.
- Benn J. y Schneider R.J. 1995. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. Proc Natl Acad Sci U S A. 92: 11215–11219.
- Benn J., Su F., Doria M. y Schneider R.J. 1996. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. J Virol. 70: 4978–4985.
- Bereiter-Hahn J. y Voth M. 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. Microsc Res Tech. 27: 198-219.
- Bergametti F., Prigent S., Lubet B., Benoit A., Tiollais P., Sarasin A. y Transy C. 1999. The proapoptotic effect of hepatitis B virus HBx protein correlates with transactivation activity in stably transfected cell lines. Oncogene. 18: 2860–2871.
- Bergametti F., Sitterlin D. y Transy C. 2002. Turnover of hepatitis B virus X protein is regulated by damaged DNA-binding complex. J Virol. 76: 6495–6501.
- Billet O., Grimber G., Levrero M., Seye K.A., Briand P. y Joulin V. 1995. In vivo activity of the hepatitis B virus core promoter: Tissue specificity and temporal regulation. J Virol. 69: 5912–5916.



- Blackberg J. y Kidd-Ljunggren K. 2003. Mutations within the hepatitis B virus genome among chronic hepatitis B patients with hepatocellular carcinoma. *J Med Virol.* 71: 18-23.
- Blumberg B.S., Alter H.J. y Visnich S. 1965. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA.* 191: 541–546.
- Blumberg B.S., Gerstley B.J., Hungerford D.A., London W.T. y Sutnick A.I. 1967. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis. *Ann Intern Med.* 66: 924–931.
- Blumberg B.S. 1977. Australia antigen and the biology of hepatitis B. *Science.* 197:17–25.
- Blumberg B.S. y Krugman S., moderadores. Passive and active immunization and treatment. En: Szmunes W, Alter HJ, Maynard JE, eds. 1982. *Viral Hepatitis—1981 International Symposium.* Philadelphia: Franklin Institute Press. 377–544.
- Borner C. 2003. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol.* 39: 615-647.
- Bouchard M.J., Wang L.H. y Schneider R.J. 2001a. Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science.* 294: 2376–2378.
- Bouchard M.J., Giannakopoulos S., Wang E.H., Tanese N. y Schneider R.J. 2001b. Hepatitis B virus HBx protein activation of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complexes and G1 transit via a Src kinase pathway. *J Virol.* 75: 4247–4257.
- Bouchard M.J., Puro R.J., Wang L. y Schneider R.J. 2003. Activation and inhibition of cellular calcium and tyrosine kinase signaling pathways identify targets of the HBx protein involved in hepatitis B virus replication. *J Virol.* 77: 7713–7719.
- Bouchard M.J. y Schneider R.J. 2004. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J Virol.* 78: 12725–12734.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Bressac B., Galvin K.M., Liang T.J., Isselbacher K.J., Wands J.R. y Ozturk M. 1990. Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 1973-1977.
- Bressac B., Kew M., Wands J. y Ozturk M. 1991. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature.* 350: 429–431.
- Bruss V. y Ganem D. 1991. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 1059–1063.

- Buckwold V.E, Xu Z., Chen M., Yen T.S. y Ou J.H. 1996. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol.* 70: 5845-5851.
- Calvisi D.F., Ladu S., Pinna F., Frau M., Tomasi M.L., Sini M., Simile M.M., Bonelli P., Muroli M.R., Seddaiu M.A., Lim D.S., Feo F. y Pascale R.M. 2009. SKP2 and CKS1 promote degradation of cell cycle regulators and are associated with hepatocellular carcinoma prognosis. *Gastroenterology.* 137: 1816–1826.
- Canettieri G., Morantte I., Guzman E., Asahara H., Herzig S., Anderson S.D., Yates J.R. y Montminy M. 2003. Attenuation of a phosphorylation-dependent activator by an HDAC-PP1 complex. *Nat Struct Biol.* 10: 175–181.
- Cecconi F. y Levine B. 2008. The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. *Dev Cell.* 15: 344–357.
- Cha M.Y., Ryu D.K., Jung H.S., Chang H.E. y Ryu W.S. 2009. Stimulation of hepatitis B virus genome replication by HBx is linked to both nuclear and cytoplasmic HBx expression. *J Gen Virol.* 90: 978–986.
- Chami M., Ferrari D., Nicotera P., Paterlini-Brechot P. y Rizzuto R. 2003. Caspase dependent alterations of Ca<sup>2+</sup> signaling in the induction of apoptosis by Hepatitis B virus X protein. *J Biol Chem.* 10: 10.
- Chen H.S., Kanako S., Girones R., Anderson R.W., Hornbuckle W.E., Tennant B.C., Cote P.J., Gerin J.L., Purcell R.H. y Miller R.H. 1993. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J Virol.* 67: 1218–1226.
- Chen T. y Li E. 2004. Structure and function of eukaryotic DNA methyl transferases. *Curr Top Dev Biol.* 60: 55–89.
- Cheong J., Yi M., Lin Y. y Murakami S. 1995. Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human Hepatitis B Virus X protein and may play a role in X transactivation. *EMBO J.* 14: 143–150.
- Chipuk J.E., Moldoveanu T., Llambi F., Parsons M.J. y Green D.R. 2010. The Bcl-2 family reunion. *Mol cell.* 37: 299-310.
- Chiramel A.I., Brady N.R. y Bartenschlager R. 2013. Divergent roles of autophagy in virus infection. *Cells.* 2: 83-104.
- Chirillo P., Falco M., Puri P.L., Artini M., Balsano C., Levrero M. y Natoli G. 1996. Hepatitis B virus pX activates NF-kappa B-dependent transcription through a Raf-independent pathway. *J Virol.* 70: 641–646.

- Chirillo P., Pagano S., Natoli G., Puri P., Burgio V., Balsano C. y Levrero M. 1997. The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 8162-8167.
- Chisari F.V. y Ferrari C. 1995. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol.* 13: 29-60.
- Chotiyaputta W. y Lok A.S. 2009. Hepatitis B virus variants. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 6: 453-462.
- Chung T.W., Lee Y.C., Ko J.H. y Kim C.H. 2003. Hepatitis B Virus X protein modulates the expression of PTEN by inhibiting the function of p53, a transcriptional activator in liver cells. *Cancer Res.* 63: 3453–3458.
- Clippinger A.J. y Bouchard M.J. 2008. Hepatitis B virus HBx protein localizes to mitochondria in primary rat hepatocytes and modulates mitochondrial membrane potential. *J Virol.* 82: 6798–6811.
- Clippinger A.J., Gearhart T.L. y Bouchard M.J. 2009. Hepatitis B virus X protein modulates apoptosis in primary rat hepatocytes by regulating both NF- $\kappa$ B and the mitochondrial permeability transition pore. *J Virol.* 83: 4718–4731.
- Dandri M., Petersen J., Stockert R.J., Harris T.M. y Rogler C.E. 1998. Metabolic labeling of woodchuck hepatitis B virus X protein in naturally infected hepatocytes reveals a bimodal half-life and association with the nuclear framework. *J Virol.* 72: 9359–9364.
- Dane D.S., Cameron C.H. y Briggs M. 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet.* 1: 695–698.
- Deretic V. y Levine B. 2009. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe.* 5: 527–549.
- Devesa M., Rodriguez C., Leon G., Liprandi F. y Pujol F.H. 2004. Clade analysis and surface antigen polymorphism of hepatitis B virus American genotypes. *J Med Virol.* 72: 377–384.
- Diao J., Khine A.A., Sarangi F., Hsu E., Iorio C., Tibbles L.A., Woodgett J.R., Penninger J. y Richardson C.D. 2001. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem.* 276: 8328–8340.
- Doitsh G. y Shaul Y. 1999. HBV transcription repression in response to genotoxic stress is p53-dependent and abrogated by pX. *Oncogene.* 18: 7506–7513.

- Domingo E., Sheldon J. y Perales C. 2012. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76: 159-216.
- Dreux M., Gastaminza P., Wieland S.F. y Chisari F.V. 2009. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 14046-14051.
- Duran A., Linares J.F., Galvez A.S., Wikenheiser K., Flores J.M., Diaz-Meco M.T. y Moscat J. 2008. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell.* 13: 343-354.
- Elmore L.W., Hancock A.R., Chang S.F., Wang X.W., Chang S., Callahan C.P., Geller D.A., Will H. y Harris C.C. 1997. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 14707–14712.
- Fattovich G., Bortolotti F. y Donato F. 2008. Natural history of chronic hepatitis B: Special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol.* 48: 335-352.
- Feitelson M.A., Zhu M., Duan L.X. y London W.T. 1993. Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 8: 1109–1117.
- Fields B.N. et al. 2002. *Virology.* Lippincott Williams and Wilkins. Fourth edition.
- Fields B.N. et al. 2013. *Virology.* Lippincott Williams and Wilkins. Sixth edition.
- Fliiss P.M., Jowers T.P., Brinkmann M.M., Holstermann B., Mack C., Dickinson P., Hohenberg H., Ghazal P. y Brune W. 2012. Viral mediated redirection of NEMO/IKKgamma to autophagosomes curtails the inflammatory cascade. *PLoS Pathog.* Doi: 10.1371/journal.ppat.1002517.
- Forgues M., Marrogi A.J., Spillare E.A., Wu C.G., Yang Q., Yoshida M., y Wang X.W. 2001. Interaction of the hepatitis B virus X protein with the Crm1-dependent nuclear export pathway. *J Biol Chem.* 276: 22797–22803.
- Fox J.P., Manso C., Penna H.A. y Para M. 1942. Observations on occurrence of icterus in Brazil following vaccination against yellow fever. *Am J Hyg.* 36: 63–116.
- França P.H., González J.E., Munné M.S., Brandão L.H., Gouvea V.S., Sablon E. y Vanderborght B.O. 2004. Strong association between genotype F and hepatitis B virus (HBV) e antigen-negative variants among HBV infected Argentinean blood donors. *J Clin Microbiol.* 42: 5015–5021.
- Gannagé M., Dormann D., Albrecht R., Dengjel J., Torossi T., Rämer P.C., Lee M., Strowig T., Arrey F., Conenello G., Pypaert M., Andersen J., García-Sastre A. y

- Münz C. 2009. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe*. 6: 367-380.
- Ganem D. y Prince A.M. 2004. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*. 350: 1118-1129.
- Garcia P.D., Ou J.H., Rutter W.J. y Walter P. 1988. Targeting of the hepatitis B virus precore protein to the endoplasmic reticulum membrane: after signal peptide cleavage translocation can be aborted and the product released into the cytoplasm. *J Cell Biol*. 106: 1093–1104.
- Gavilanes F., Gonzalez-Ros J.M. y Peterson D.L. 1982. Structure of hepatitis B surface antigen: Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. *J Biol Chem*. 257: 7770–7777.
- Gearhart T.L. y Bouchard M.J. 2010. The hepatitis B virus X protein modulates hepatocyte proliferation pathways to stimulate viral Replication. *J Virol*. 84: 2675–2686
- Geng X., Huang C., Qin Y., McCombs J.E., Yuan Q., Harry B.L., Palmer A.E., Xia N.S. y Xue D. 2012. Hepatitis B virus X protein targets Bcl-2 proteins to increase intracellular calcium, required for virus replication and cell death induction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109: 18471-18476.
- Glebe D. y Urban S. 2007. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol*. 13: 22-38.
- Gomes L.C., Di Benedetto G. y Scorrano L. 2011. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol*. 13: 589–598.
- González J. 2009. Informe Epidemiológico Número 10. Programa Nacional de Control de Hepatitis Virales en Argentina.
- Gottlob K., Pagano S., Levrero M. y Graessmann A. 1998a. Hepatitis B virus X protein transcription activation domains are neither required nor sufficient for cell transformation. *Cancer Res*. 58: 3566–3570.
- Gottlob K., Fulco M., Levrero M. y Graessmann A. 1998b. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J Biol Chem*. 273: 33347–33353.
- Gupta A., Mal T.K., Jayasuryan N. y Chauhan V.S. 1995. Assignment of disulphide bonds in the X protein (HBx) of hepatitis B virus. *Biochem Biophys Res Commun*. 212: 919–924.
- Hadziyannis S.J. y Papatheodoridis G.V. 2006. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B: natural history and treatment. *Semin Liver Dis*. 26: 130-141.

- Haviv I., Shamay M., Doitsh O. y Shaul Y. 1998. Hepatitis B virus pX targets TFIIB in transcription coactivation. *Mol Cell Biol.* 18: 1562–1569.
- Hayes J.D. y McMahon M. 2012. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci.* 34: 176-188.
- He P., Zhou G., Qu D., Zhang B., Wang Y. y Li D. 2013. HBx inhibits proliferation and induces apoptosis via Fas/FasL upregulation in rat renal tubular epithelial cells. *J Nephrol.* 26: 1033-1041.
- Heaton N.S y Randall G. 2010. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe.* 8: 422-432.
- Henkler F., Hoare J., Waseem N., Goldin R.D., McGarvey M.J., Koshy R. y King, I. A. 2001. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol.* 82: 871–882.
- Hu Z., Zhang Z., Doo E., Coux O., Goldberg A.L. y Liang T.J. 1999. Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J Virol.* 73: 7231–7240.
- Huang S.C., Chang C.L., Wang P.S., Tsai Y. y Liu H.S. 2009. Enterovirus 71-induced autophagy detected in vitro and in vivo promotes viral replication. *J Med Virol.* 81: 1241-1252.
- Huang Y., Tong S., Tai A.W., Hussain M. y Lok A.S.F. 2011. Hepatitis B virus core promoter mutations contribute to hepatocarcinogenesis by deregulating SKP2 and its target, p21. *Gastroenterology.* 14: 1412-1421.
- Huang Y., Tai A.W., Tong S. y Lok A.S. 2013. HBV core promoter mutations promote cellular proliferation through E2F1-mediated upregulation of S-phase kinase-associated protein 2 transcription. *J Hepatol.* 58: 1068-1073.
- Jaitovich-Groisman I., Benlimame N., Slagle B.L., Perez M.H., Alpert L., Song D. J., Fotouhi-Ardakani N., Galipeau J. y Alaoui-Jamali M.A. 2001. Transcriptional regulation of the TFIIH transcription repair components XPB and XPD by the hepatitis B virus x protein in liver cells and transgenic liver tissue. *J Biol Chem.* 276: 14124–14132.
- Jung J.K., Arora P., Pagano J.S y Jang K.L. 2007. Expression of DNA methyltransferase 1 is activated by hepatitis B virus x protein via a regulatory circuit involving the p16INK4A-cyclinD1-CDK 4/6-pRb-E2F1 pathway. *Cancer Res.* 67: 5771–5778.
- Kanda T., Yokosuka O., Imazeki F., Yamada Y., Imamura T., Fukai K., Nagao K. y Saisho H. 2004. Hepatitis B virus X protein (HBx)-induced apoptosis in HuH-7 cells:

- influence of HBV genotype and basal core promoter mutations. *Scand J Gastroenterol.* 39: 478-485.
- Kang-Park S., Im J.H., Lee J.H. y Lee Y.I. 2006. PTEN modulates hepatitis B virus-X protein induced survival signaling in Chang liver cells. *Virus Res.* 122: 53–60.
- Kao J.H., Chen P.J., Lai M.Y. y Chen D.S. 2003. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology.* 124: 327–334.
- Ke P.Y. y Chen S.S. 2011. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J Clin Invest.* 121: 37-56.
- Keasler V.V., Hodgson A.J., Madden C.R. y Slagle B.L. 2007. Enhancement of hepatitis B virus replication by the regulatory X protein in vitro and in vivo. *J Virol.* 81: 2656–2662.
- Keasler V.V., Hodgson A.J., Madden C.R. y Slagle B.L. 2009. Hepatitis B virus HBx protein localized to the nucleus restores HBx-deficient virus replication in HepG2 cells and in vivo in hydrodynamically-injected mice. *Virology.* 390: 122–129.
- Kelekar A. y Thompson C.B. 1998. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 8: 324-330.
- Kerr J.F., Wyllie A.H. y Currie A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26: 239-257.
- Kim C.M., Koike K., Saito I., Miyamura T. y Jay G. 1991. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature.* 351: 317–320.
- Kim H., Lee H. y Yun Y. 1998. X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells. *J Biol Chem.* 273: 381–385.
- Kim K.H. y Seong B.L. 2003. Pro-apoptotic function of HBV X protein is mediated by interaction with c-FLIP and enhancement of death-inducing signal. *EMBO J.* 22: 2104–2116.
- Kim S., Kim H.Y., Lee S., Kim S.W., Sohn S., Kim K. y Cho H. 2007. Hepatitis B virus x protein induces perinuclear mitochondrial clustering in microtubule- and Dynein-dependent manners. *J. Virol.* 81: 1714–1726.
- Kim H., Kim S., Kim J., Lee H., Choi M., Kim J. y Ahn J. 2008. Hepatitis B virus X protein induces apoptosis by enhancing translocation of Bax to mitochondria. *IUBMB.* 60: 473–480.

- Kim K.H. y Lee M.S. 2014. Autophagy-a key player in cellular and body metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 10: 322-337.
- Klein N.P. y Schneider R.J. 1997. Activation of Src family kinases by hepatitis B virus HBx protein and coupled signaling to Ras. *Mol Cell Biol.* 17: 6427–6436.
- Klionsky D.J., Abdalla F.C., Abeliovich H., Abraham R.T., Acevedo-Arozena A., Adeli K., et al. 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 8: 445-544.
- Kock J., Rosler C., Zhang J.J., Blum H.E., Nassal M. y Thoma C. 2010. Generation of covalently closed circular DNA of hepatitis B viruses via intracellular recycling is regulated in a virus specific manner. *PLoS Pathog.* Doi: 10.1371/journal.ppat.1001082.
- Koike K., Moriya K., Iino S., Yotsuyanagi H., Endo Y., Miyamura T. y Kurokawa K. 1994a. High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology.* 19: 810–819.
- Koike K., Moriya K., Yotsuyanagi H., Iino S. y Kurokawa K. 1994b. Induction of cell cycle progression by hepatitis B virus HBx gene expression in quiescent mouse fibroblasts. *J Clin Invest.* 94: 44–49.
- Koike K. 2002. Hepatocarcinogenesis in hepatitis viral infection: Lessons from transgenic mouse studies. *J Gastroenterol.* 37: 55–64.
- Kroemer G., Galluzzi L. y Brenner C. 2008. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 87: 99-163.
- Ku B., Woo J.S., Liang C., Lee K.H., Hong H.S., E X., Kim K.S., Jung J.U. y Oh B.H. 2008. Structural and biochemical bases for the inhibition of autophagy and apoptosis by viral BCL-2 of murine gamma-herpesvirus 68. *PLoS Pathog.* Doi: 10.1371/journal.ppat.0040025.
- Kudchodkar S.B. y Levine B. 2009. Viruses and autophagy. *Rev Med Virol.* 19: 359–378.
- Kumar V. y Sarkar D.P. 2004. Hepatitis B virus X protein (HBx): structure–function relationships and role in viral pathogenesis. Springer-Verlag, Berlin. 166: 377-407.
- Kuo C.Y., Wang J.C., Hsu S.L. y Hwang G.Y. 2008. Functional characterization of hepatitis B virus X protein based on the inhibition of tumorigenesis in nude mice injected with CCL13-HBx cells. *Intervirology.* 51: 253-260.
- Kyei G.B., Dinkins C., Davis A.S., Roberts E., Singh S.B., Dong C., Wu, L., Kominami E., Ueno T., Yamamoto A., Federico M., Panganiban A., Vergne I. y Deretic V. 2009.



- Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol.* 186: 255-268.
- Kwun H.J y Jang K.L. 2004. Natural variants of hepatitis B virus x protein have differential effects on the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene. *Nucleic Acids Res.* 32: 2202–2213.
- Lanford R.E., Notvall L. y Beames B. 1995. Nucleotide priming and reverse transcriptase activity of hepatitis B virus polymerase expressed in insect cells. *J Virol.* 69: 4431–4439.
- Lavanchy D. 2004. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat.* 11: 97-107.
- Lee T.H., Elledge S.J. y Butel J.S. 1995. Hepatitis B virus x protein interacts with a probable cellular DNA repair protein. *J Virol.* 69: 1107–1114.
- Lee Y.H. y Yun Y. 1998. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1 STAT signaling. *J Biol Chem.* 273: 25510–25515.
- Lee Y.I., Kim S.O., Kwon H.J., Park J.G., Sohn M.J. y Jeong S.S. 2001a. Phosphorylation of purified recombinant hepatitis B virus-X protein by mitogen-activated protein kinase and protein kinase C in vitro. *J Virol Methods* 95: 1–10.
- Lee Y.I., Kang-Park S., Do S.I. y Lee Y.I. 2001b. The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem.* 276: 16969–16977.
- Lee Y.I., Hwang J.M., Im J.H., Lee Y.I., Kim N.S., Kim D.G., Yu D.Y., Moon H.B. y Park S.K. 2004. Human hepatitis B virus-X protein alters mitochondrial function and physiology in human liver cells. *J Biol Chem.* 279: 15460–15471.
- Lee J.O., Kwun H.J., Jung J.K., Choi K.H., Min D.S. y Jang K.L. 2005. Hepatitis B virus x protein represses E-Cadherin expression via activation of DNA methyl transferase 1. *Oncogen.* 24: 6617–6625.
- Leveillard T., Andera L., Bissonnetti N., Schaeffer L., Bracco L., Egly J.M. y Wasyluk B. 1996. Functional interactions between p53 and the TFIID complex are affected by tumour-associated mutations. *EMBO J.* 15: 1615–1624.
- Levine B. y Kroemer G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 132: 27–42.
- Li J., Liu Y., Wang Z., Liu K., Wang Y., Liu J., Ding H. y Yuan Z. 2011. Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. *J Virol.* 85: 6319-6333.

- Lien J.M., Aldrich C.E. y Mason W.S. 1986. Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer for duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. *J Virol.* 57: 229–236.
- Lin C.L. Liao L.Y., Wang C.S., Chen P.J., Lai M.Y., Chen D.S. y Kao J.H. 2005a. Basal core-promoter mutant of hepatitis B virus and progression of liver disease in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Liver Int.* 25: 564–570.
- Lin N., Chen H.Y., Li D., Zhang S.J., Cheng Z.X. y Wang X.Z. 2005b. Apoptosis and its pathway in X gene-transfected HepG2 cells. *World J Gastroenterol.* 11: 4326-4331.
- Ling J., Kang Y., Zhao R., Xia Q., Lee D.F., Chang Z., Li J., Peng B., Fleming J.B., Wang H., Liu J., Lemischka I.R., Hung M.C. y Chiao P.J. 2012. KrasG12D-induced IKK2/ $\beta$ /NF- $\kappa$ B activation by IL-1 $\alpha$  and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell.* 21:105-120.
- Liu C.J., Kao J.H., Lai M.Y., Chen P.J. y Chen D.S. 2004a. Evolution of precore/core promoter mutations in hepatitis B carriers with hepatitis B e antigen seroreversion. *J Med Virol.* 74: 237–245.
- Liu C.J., Kao J.H., Lai M.Y., Chen P.J. y Chen D.S. 2004b. Precore/core promoter mutations and genotypes of hepatitis B virus in chronic hepatitis B patients with fulminant or subfulminant hepatitis. *J Med Virol.* 72: 545–550.
- Liu C.J. y Kao J.H. 2007. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiology and pathogenic role of viral factors. *JCMA* 70: 141–145.
- Liu B., Fang M., Hu Y., Huang B., Li N., Chang C., Huang R., Xu X., Yang Z., Chen Z. y Liu W. 2014. Hepatitis B virus X protein inhibits autophagic degradation by impairing lysosomal maturation. *Autophagy.* 10: 416-430.
- Livingston S.E., Simonetti J.P., McMahon B.J., Bulkow L.R., Hurlburt K.J., Homan C.E., Snowball M.M., Cagle H.H., Williams J.L. y Chulanov V.P. 2007. Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F. *J Infect Dis.* 195: 5-11.
- Lizzano R.A., Yang B., Clippinger A.J. y Bouchard M.J. 2011. The C-terminal region of the hepatitis B virus X protein is essential for its stability and function. *Virus Res.* 155: 231–239.
- Locarnini S., Littlejohn M., Aziz M.N. y Yuen L. 2013. Possible origins and evolution of the hepatitis B virus (HBV). *Semin Cancer Biol.* 23: 561-575.

- Lu Y.W. y Chen W.N. 2005. Human hepatitis B virus X protein induces apoptosis in HepG2 cells: role of BH3 domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 338: 1551–1556.
- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C. y Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 94: 481-490.
- Lurman A. 1885. Eine icterusepidemie. *Berl Klin Wochenschr.* 22: 20–23.
- MacCallum F.O. 1947. Homologous serum jaundice. *Lancet.* 2: 691–692.
- Madden C.R., Finegold M.J. y Slagle B.L. 2000. Expression of hepatitis B virus X protein does not alter the accumulation of spontaneous mutations in transgenic mice. *J Virol.* 74: 5266-5272.
- Madden C.R., Finegold M.J. y Slagle B.L. 2001. Hepatitis B virus X protein acts as a tumor promoter in development of diethylnitrosamine-induced preneoplastic lesions. *J Virol.* 75: 3851–3858.
- Magnius L.O. y Espmark J.A. 1972. Specificities in Australia antigen positive sera distinct from the LeBowvier determinants. *J Immunol.* 109: 1017–1021.
- Marusawa H., Matsuzawa S., Welsh K., Zou H., Armstrong R., Tamm I. y Reed J.C. 2003. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J.* 22: 2729–2740.
- Mathew R., Karp C.M., Beaudoin B., Vuong N., Chen G., Chen H.Y., Bray K., Reddy A., Bhanot G., Gelinas C., Dipaola R.S., Karantza-Wadsworth V. y White E. 2009. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell.* 137: 1062-1075.
- McClain S.L., Clippinger A.J., Lizzano R. y Bouchard M.J. 2007. Hepatitis B virus replication is associated with an HBx-dependent mitochondrion-regulated increase in cytosolic calcium levels. *J Virol.* 81: 12061–12065.
- Meier P., Finch A. y Evan G. 2000. Apoptosis in development. *Nature.* 407: 796-801.
- Miao J., Chen G.G., Chun S.Y. y Lai P.P. 2006. Hepatitis B virus X protein induces apoptosis in hepatoma cells through inhibiting Bcl-xL expression. *Canc Lett.* 236: 115–124.
- Milich D.R., Chen M.K., Hughes J.L. y Jones J.E. 1998. The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol.* 160: 2013-2021.

- Miller S. y Krijnse-Locker J. 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol.* 6: 363-374.
- Mizushima N., Yoshimori T. y Levine B. 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 140: 313-326.
- Mizushima N. y Komatsu M. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 147: 728-741.
- Mizushima N., Yoshimori T. y Ohsumi Y. 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 27: 107–132.
- Moriyama K., Okamoto H., Tsuda F., Mayumi M. 1996. Reduced precore transcription and enhanced core-pregenome transcription of hepatitis B virus DNA after replacement of the precore-core promoter with sequences associated with e antigen-seronegative persistent infections. *Virology.* 226: 269-280.
- Murakami S. 2001. Hepatitis B virus x protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol.* 36: 651–60.
- Murata M., Matsuzaki K., Yoshida K., Sekimoto G., Tahashi Y., Mori S., Uemura Y., Sakaida N., Fujisawa J., Seki T., Kobayashi K., Yokote K., Koike K. y Okazaki K. 2009. Hepatitis B virus X protein shifts human hepatic transforming growth factor (TGF)-beta signaling from tumor suppression to oncogenesis in early chronic hepatitis B. *Hepatology.* 49: 1203–1217.
- Noh E.J., Jung H.J., Jeong G., Choi K.S., Park H.J., Lee C.H. y Lee J.S. 2004. Subcellular localization and transcriptional repressor activity of HBx on p21 (WAF1/Cip1) promoter is regulated by ERK-mediated phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 319: 738–745.
- Norder H., Couroucé A.M. y Magnius L.O. 1994. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology.* 198: 489–503.
- Okochi K. y Murakami S. 1968. Observations on Australia antigen in Japanese. *Vox Sang.* 15: 374–385.
- Orvedahl A., Alexander D., Tallozy Z., Sun Q., Wei Y., Zhang W. Burns D. Leib D.A. y Levine B. 2007. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe.* 1: 23-35.
- Osiowy C., Giles E., Tanaka Y., Mizokami M. y Minuk G.Y. 2006. Molecular evolution of hepatitis B virus over 25 years. *J Virol.* 80: 10307-10314.

- Osiowy C., Simons B.C. y Rempel J.D. 2013. Distribution of viral hepatitis in indigenous populations of North America and the circumpolar Arctic. *Antivir Ther.* 18: 467-473.
- Ostapchuk P., Hearing P. y Ganem D. 1994. A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *EMBO J.* 13: 1048–1057.
- Pan J., Duan L.X., Sun B.S. y Feitelson M.A. 2001. Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B. *J Gen Virol.* 82: 171–182.
- Pang R., Lee T.K., Poon, R.T., Fan S.T., Wong K.B., Kwong Y.L. y Tse E. 2007. Pin1 interacts with a specific serine-proline motif of hepatitis B virus X-protein to enhance hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology.* 132: 1088–1103.
- Paraná R. y Almeida D. 2005. HBV epidemiology in Latin America. *J Clin Virol.* 34: 130–133.
- Parekh S., Zoulim F., Ahn S.H, Tsai A., Li J., Kawai S., Khan N., Trépo C., Wands J. y Tong S. 2003. Genome replication, virion secretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants. *J Virol.* 77: 6601–6612.
- Park U.S., Park S.K., Lee Y.I., Park J. G. y Lee Y.I. 2000. Hepatitis B virus-X protein upregulates the expression of p21waf1/cip1 and prolongs G1S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells. *Oncogene.* 19: 3384–3394.
- Park I.N., Sohn B.H., Yu E., Suh D.J., Chung Y.H., Lee J.H., Surzycki S.J. y Lee Y.I. 2007. Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus x protein. *Gastroenterology.* 132: 1476–1494.
- Pattingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang X.H., Mizushima N., Packer M., Schneider M.D. y Levine B. 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1- dependent autophagy. *Cell.* 122: 927–939.
- Pezzano S.C., Torres C., Fainboim H.A., Bouzas M.B., Schroder T., Giuliano S.F., Paz S., Alvarez E., Campos R.H. y Mbayed V.A. 2011. Hepatitis B virus in Buenos Aires, Argentina: genotypes, virological characteristics and clinical outcomes. *Clin Microbiol Infect.* 17: 223-231.
- Piñeiro y Leone F.G., Mbayed V.A. y Campos R.H. 2003. Evolutionary history of hepatitis B virus genotype F: An in-depth analysis of Argentine isolates. *Virus Genes.* 27: 103–110.
- Powell R. y Gannon F. 2002. Purification of DNA by phenol extraction and ethanol precipitation. Oxford University Press.

- Prange R. y Streeck R.E. 1995. Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *EMBO J.* 14: 247–256.
- Prince A.M. 1968. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 60: 814–821.
- Qadri I., Maguire H.F. y Siddiqui A. 1995. Hepatitis B virus transactivator protein X interacts with the TATA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 1003–1007.
- Qadri I., Conaway J.W., Conaway R.C., Schaack J. y Siddiqui A. 1996. Hepatitis B virus transactivator protein, HBx, associates with components of TFIID and stimulates the DNA helicase activity of TFIID. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 93: 10578–10583.
- Qiao L., Leach K., McKinsty R., Gilfor D., Yacoub A., Park J.S., Grant S., Hylemon P.B., Fisher P.B. y Dent P. 2001. Hepatitis B virus X protein increases expression of p21(Cip-1/WAF1/MDA6) and p27(Kip-1) in primary mouse hepatocytes, leading to reduced cell cycle progression. *Hepatology.* 34: 906–917.
- Rahmani Z., Huh K.W., Lasher R. y Siddiqui A. 2000. Hepatitis B virus X protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential. *J Virol.* 74: 2840–2846.
- Rawat S., Clippinger A.J. y Bouchard M.J. 2012. Modulation of apoptotic signaling by the hepatitis B virus X protein. *Viruses.* 4: 2945-2972.
- Robinson W.S. 1994. Molecular events in the pathogenesis of hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma. *Annu Rev Med.* 45: 297–301.
- Rui E., Moura P.R., Goncalves Kde A. y Kobarg J. 2005. Expression and spectroscopic analysis of a mutant hepatitis B virus onco-protein HBx without cysteine residues. *J Virol Methods* 126: 65–74.
- Salvesen G.S. y Renatus M. 2002. Apoptosome: the seven-spoked death machine. *Dev Cell* 2: 256-257.
- Sánchez-Tapias J.M., Costa J., Mas A., Bruguera M. y Rodés J. 2002. Influence of hepatitis B virus genotype on long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology.* 123: 1848-1856.
- Saraste A. y Pulkki K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 45: 528-537.
- Sartorius U., Schmitz I. y Krammer P.H. 2001. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem.* 2: 20-29.

- Scaglioni P.P., Melegari M. y Wands J.R. 1997. Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame. *Virology*. 233: 374-381.
- Schek N., Bartenschlager R., Kuhn C. y Schaller H. 1991. Phosphorylation and rapid turnover of hepatitis B virus X-protein expressed in HepG2 cells from a recombinant vaccinia virus. *Oncogene* 6: 1735-1744.
- Schuster R., Gerlich W.H. y Schaefer S. 2000. Induction of apoptosis by the transactivating domains of the hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts. *Oncogene* 19: 1173-1180.
- Seeger C. y Mason W. 2000. Hepatitis B Virus Biology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 64: 51-68.
- Seifer M., Hohne M., Schaefer S. y Gerlich W.H. 1991. In vitro tumorigenicity of hepatitis B virus DNA and HBx protein. *J Hepatol*. 13: S61-S65.
- Sherr C.J y Roberts J.M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 13: 1501-1512.
- Shih W.L., Kuo M.L., Chuang S.E., Cheng A.L. y Doong S.L. 2000. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor- $\beta$ -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem*. 275: 25858-25864.
- Shirakata Y. y Koike K. 2003. Hepatitis B virus X protein induces cell death by causing loss of mitochondrial membrane potential. *J Biol Chem*. 278: 22071-22078.
- Shrivastava S., Raychoudhuri A., Steele R., Ray R. y Ray R.B. 2011. Knockdown of autophagy enhances the innate immune response in hepatitis C virus-infected hepatocytes. *Hepatology*. 53: 406-414.
- Sir D., Tian Y., Chen W.L., Ann D.K., Yen T.S. y Ou J.H. 2010. The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 4383-4388.
- Sirma H., Giannini C., Poussin K., Paterlini P., Kremsdorf D. y Brechot C. 1999. Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx. *Oncogene* 18: 4848-4859.
- Slagle B.L., Lee T.H., Medina D., Finegold M.J. y Butel J.S. 1996. Increased sensitivity to the hepatocarcinogen diethylnitrosamine in transgenic mice carrying the hepatitis B virus x gene. *Mol Carcinog*. 15: 261-269.

- Solari J., Galdame O., Rezzonico L., Frider B., Villamil A., Casciato P., Reig M., Bandi J.C., Alessio A. y Gadano A. 2009. Twenty-four weeks therapy with peginterferon alfa-2a could be similar to 48 weeks therapy in patients with HBeAg positive chronic hepatitis B and good predictors of response: results of a pilot study. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 39: 254-260.
- Stuyver L., De Gendt S., Van Geyt C., Zoulim F., Fried M., Schinazi R.F y Rossau R. 2000. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol.* 81: 67–74.
- Su F. y Schneider R. 1997. Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 8744–8749.
- Su Q., Schroder C.H., Otto G. y Bannasch P. 2000. Overexpression of p53 protein is not directly related to hepatitis B x protein expression and is associated with neoplastic progression in hepatocellular carcinomas rather than hepatic preneoplasia. *Mutat Res.* 462: 365–380.
- Taguwa S., Kambara H., Fujita N., Noda T., Yoshimori T., Koike K., Moriishi K. y Matsuura Y. 2011. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J Virol.* 85:13185-13194.
- Takada S., Shirakata Y., Kaneniwa N. y Koike K. 1999. Association of hepatitis B virus X protein with mitochondria causes mitochondrial aggregation at the nuclear periphery, leading to cell death. *Oncogene.* 18: 6965–6973.
- Tang H., Da L., Mao Y., Li Y., Li D., Xu Z., Li F., Wang Y., Tiollais P., Li T. y Zhao M. 2009. Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of beclin 1 expression. *Hepatology.* 49: 60-71.
- Tang R.X., Kong F.Y., Fan B.F., Liu X.M., You H.J., Zhang P. y Zheng K.Y. 2012. HBx activates FasL and mediates HepG2 cell apoptosis through MLK3-MKK7 JNKs signal module. *World J Gastroenterol.* 18: 1485-1495.
- Tanida I., Ueno T. y Kominami E. 2008. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol* 445: 77-88.
- Tardif K.D. y Siddiqui A. 2003. Cell surface expression of major histocompatibility complex class I molecules is reduced in hepatitis C virus subgenomic replicon-expressing cells. *J Virol.* 77: 11644-11650.
- Tarn C., Zou L., Hullinger R.L. y Andrisani O.M. 2002. Hepatitis B virus X protein activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in dedifferentiated hepatocytes. *J Virol.* 76: 9763–9772.



- Terazawa S., Kojima M., Yamanaka T., Yotsumoto S., Okamoto H., Tsuda F., Miyakawa Y. y Mayumi M. 1991. Hepatitis B virus mutants with precore-region defects in two babies with fulminant hepatitis and their mothers positive for antibody to hepatitis B e antigen. *Pediatr Res.* 29: 5-9.
- Terradillos O., Billet O., Renard C.A., Lévy R., Molina T., Briand P. y Buendia M.A. 1997. The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene.* 14: 395–404.
- Terradillos O., de La Coste A., Pollicino T., Neuveut C., Sitterlin D., Lecoœur H., Gougeon M.L., Kahn A. y Buendia M.A. 2002. The hepatitis B virus X protein abrogates Bcl-2 mediated protection against Fas apoptosis in the liver. *Oncogene.* 21: 377-386.
- Tian Y., Sir D., Kuo C.F., Ann D.K. y Ou J.H. 2011. Autophagy required for hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol.* 85: 13453-13456.
- Tong S., Li J., Wands J.R. y Wen Y. 2013. Hepatitis B virus genetic variants: biological properties and clinical implications. *Emerg Microbes Infect.* 2(3): e10.
- Truant R., Antunovic J., Greenblatt J., Prives C. y Cromlish J.A. 1995. Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition of p53 response element directed transactivation. *J Virol.* 69: 1951–1959.
- Twu J.S., Lai M.Y., Chen D.S. y Robinson W.S. 1993. Activation of protooncogene c-jun by the X protein of hepatitis B virus. *Virology.* 192: 346–350.
- Urban S., Hildt E., Eckerskorn C., Sirma H., Kekule A. y Hofschneider, P.H. 1997. Isolation and molecular characterization of hepatitis B virus X-protein from a baculovirus expression system. *Hepatology.* 26: 1045–1053.
- Venegas M., Poniachik J., Fuster F., Hurtado C., Villanueva R.A. y Brahm J. 2014. Genotype F of hepatitis B: response to interferon. *Antivir Ther.* Doi: 10.3851/IMP2886.
- Vousden K.H. y Lane D.P. 2007. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8: 275–283.
- Wang X.W., Forrester K., Yeh H., Feitelson M.A., Gu J.R. y Harris C.C. 1994. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 91: 2230–2234.
- Wang X.W., Yeh H., Schaeffer L. et al. 1995. P53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nature.* 10: 188–195.

- Wang Y., Cui F., Lv Y., Li C., Xu X., Deng C., Wang D., Sun Y., Hu G., Lang Z., Huang C. y Yang X. 2004. HBsAg and HBx knocked into the p21 locus causes hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*. 39: 318–324.
- Wang P., Guo Q.S., Wang Z.W. y Qian H.X. 2013. HBx induces HepG-2 cells autophagy through PI3K/Akt-mTOR pathway. *Mol Cell Biochem*. 372: 161-168.
- Weil R., Sirma H., Giannini C., Kremsdorf D., Bessia C., Dargemont C., Brechot C. y Israel A. 1999. Direct association and nuclear import of the hepatitis B virus X protein with the NF-kappaB inhibitor I kappa Balpha. *Mol Cell Biol*. 19: 6345–6354.
- WHO, 2008. Hepatitis B. Fact sheet N° 204. World Health Organization (WHO).
- Wu B.K., Li C.C., Chen H.J., Chang J.L., Jeng K.S., Chou C.K., Hsu M.T. y Tsai T.F. 2006. Blocking of G1/S transition and cell death in the regenerating liver of Hepatitis B virus X protein transgenic mice. *Biochem. Biophys Res Commun*. 340: 916–928.
- Wu, C., Zhang, X., Tian, Y., Song J., Yang D., Roggendorf M., Lu M. y Chen X. 2010. Biological significance of amino acid substitutions in hepatitis B surface antigen (HBsAg) for glycosylation, secretion, antigenicity and immunogenicity of HBsAg and hepatitis B virus replication. *J Gen Virol*. 91: 483–492.
- Xu Z., Yen T.S., Wu L., Madden C.R., Tan W., Slagle B.L. y Ou J.H. 2002. Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice. *J Virol*. 76: 2579–2584.
- Yan H., Zhong G., Xu G., He W., Jing Z., Gao Z., Huang Y., Qi Y., Peng B., Wang H., Fu L., Song M., Chen P., Gao W., Ren B., Sun Y., Cai T., Feng X., Sui J. y Li W. 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D viruses. *Elife*. Doi: 10.7554/eLife.00049.
- Yang C.H. y Cho M. 2013. Hepatitis B virus gene differentially modulates cell cycle progression and apoptotic protein expression in hepatocyte versus hepatoma cell lines. *J Viral Hepat*. 20: 50-58.
- Yoon Y.J., Chang H.Y., Ahn S.H., Kim J.K., Park Y.K., Kang D.R., Park J.Y., Myoung S.M., Kim do Y., Chon C.Y. y Han K.H. 2008. MDM2 and p53 polymorphisms are associated with the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Carcinogenesis*. 29: 1192–1196.
- Yu X. y Mertz J.E. 1997. Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoters of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily. *J Virol*. 71: 9366-9374.

- Yun C., Um HR., Jin Y., Wang J.H., Lee M.O., Park S., Lee J.H. y Hyeseong C. 2002. NF- $\kappa$ B activation by hepatitis B virus X (HBx) protein shifts the cellular fate toward survival. *Canc Lett.* 18: 97-104.
- Zhang Z., Torii N., Furusaka A., Malayaman N., Hu Z. y Liang T.J. 2000. Structural and functional characterization of interaction between hepatitis B virus X protein and the proteasome complex. *J Biol Chem.* 275: 15157–15165.
- Zhang Z., Torii N., Hu Z., Jacob J. y Liang T.J. 2001. X-deficient woodchuck hepatitis virus mutants behave like attenuated viruses and induce protective immunity in vivo. *J Clin Invest.* 108: 1523–1531.
- Zhang Z., Protzer U., Hu Z., Jacob J. y Liang T.J. 2004. Inhibition of cellular proteasome activities enhances hepadnavirus replication in an HBX-dependent manner. *J Virol.* 78: 4566–4572.
- Zhang H.T., Chen G.G., Hu B.G., Zhang Z.Y., Yun J.P., He M.L. y Lai P.B. 2014. Hepatitis B virus x protein induces autophagy via activating death-associated protein kinase. *J Viral Hepat.* 21: 642-649.
- Zheng Y., Li J. y Ou J.H. 2004. Regulation of hepatitis B virus core promoter by transcription factors HNF1 and HNF4 and the viral X protein. *J Virol.* 78: 6908-6914.
- Ziegler U. y Groscurth P. 2004. Morphological features of cell death. *Physiology.* 19: 124-128.
- Zoulim F., Saputelli J. y Seeger C. 1994. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol.* 68: 2026–2030.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral han sido presentados en diferentes reuniones científicas y formarán parte de la siguiente publicación:

#### **Participación en reuniones científicas:**

XVII Congreso Argentino de Hepatología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. 6-8 de junio de 2013. Actividad biológica de distintas variantes de la proteína X del virus de la hepatitis B genotipo F en hepatocitos en cultivo. **Elizalde M.**, Campos R., Barbini L. Poster. Publicado en: Acta Gastroenterologica Latinoamericana 2013, 43(I): 23.

XIII Congreso Argentino de Microbiología (CAM), II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental (DIMAyA). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. 23-26 de septiembre de 2013. Estudio comparativo de la actividad biológica de distintas variantes de la proteína X del virus de la hepatitis B genotipo F. **Elizalde M.**, Campos R., Barbini L. Poster. Publicado en: Revista Argentina de Microbiología 2013, 45(I): 52-53.

LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata, Argentina. 19-22 de noviembre de 2014. Variantes de la proteína X del virus de la hepatitis B genotipo F inducen la apoptosis y la autofagia de hepatocitos humanos en cultivo. **Elizalde M.**, Campos R., Barbini L. Poster. Publicado en: Medicina (Buenos Aires) 2014, 74(III): 216.

XVII Congreso Argentino de Hepatología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. 4-6 de junio de 2015. Impacto de las mutaciones K130M V131I sobre la actividad biológica en hepatocitos humanos de la proteína X del virus de la hepatitis B de los subgenotipos de mayor prevalencia en la región. **Elizalde M.**, Campos R., Barbini L. Poster. Publicado en: Acta Gastroenterológica Latinoamericana 2015, 45(II): 11.

XI Congreso Argentino de Virología (CAV), II Congreso Latinoamericano de Virología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. 23-26 de junio de 2015. Caracterización biológica de variantes de la proteína X del virus de la hepatitis B de distintos subgenotipos en hepatocitos humanos. **Elizalde M.**, Campos R., Barbini L. Poster.

**Publicación científica en preparación:**

**Elizalde M.**, Campos R., Barbini L. Comparative study of the biological activity of different variants of hepatitis B virus X protein. Manuscrito en preparación.