



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Farmacia y Bioquímica

Tesis para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

**Evolución del virus de hepatitis B. Análisis de
mecanismos involucrados en el establecimiento y
progresión de la infección viral**

BIOQ. INA SEVIC

Año 2017

Dirección de Tesis: Dr. Rodolfo Héctor Campos

Área: Virología

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

Bioq. Ina Sevic

Dr. Rodolfo Héctor Campos

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Duda y Mió.

A mi hermana Milkačica.

A Luigi.

A mi director Dr. Rodolfo Campos.

A mis compañeros y amigos del laboratorio.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

A la Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

A la Universidad de Buenos Aires.

A todos ellos, muchas gracias.

PUBLICACIONES

Los resultados experimentales presentados en este trabajo de tesis forman parte de siguientes publicaciones:

- **Trabajos publicados en revistas con referato**

- HBV DNA genome co-transfection procedure for the evaluation of relative fitness.
Ina Sevic, María Mora González López Ledesma, Diego Martin Flichman, Rodolfo Hector Campos. 2017.
PLoS ONE 12(5): e0175543. Doi:10.1371/journal.pone.0175543

- **Trabajos en revisión**

- Analysis of fitness differences of HBV viral variants by co-transfection assay.
Ina Sevic, María Mora González López Ledesma, María Mercedes Elizalde, Diego Martin Flichman, Rodolfo Hector Campos.

RESUMEN

El virus de hepatitis B (HBV), debido a su estructura poblacional de cuasiespecie, circula como un conjunto de variantes genéticamente relacionadas que evolucionan a lo largo de la infección crónica. La evolución de la población viral, ya sea en la infección en un mismo paciente o en una población de individuos, resulta de un complejo equilibrio entre diversas subpoblaciones virales que dependiente tanto de factores virales como del hospedador. Como resultado del proceso evolutivo, se fijan aquellas subpoblaciones virales que presenten el mayor *fitness* para cada situación particular durante la infección crónica.

La fijación de las subpoblaciones virales durante el proceso de la infección crónica por HBV podría estar mediada, en parte, por una ventaja relativa de su capacidad replicativa a nivel celular (*fitness* replicativo). Para evaluar esta hipótesis se desarrolló una metodología que permite cuantificar dicha ventaja replicativa. A partir de la cotransfección con las variantes a evaluar se determina la frecuencia relativa de las mismas por clonado y posterior análisis por RFLP de la progenie viral. Esta determinación fue utilizada para el análisis de dos situaciones evolutivas: a.- la evolución intrahospedador en la infección crónica (seroconversión/fijación de mutantes) y b.- la evolución interhospedador (la ocupación del nicho ecológico /prevalencia de (sub)genotipos).

Respecto a la evolución intrahospedador ha sido recientemente informado (Sede et al. (2014) la coexistencia de tres subpoblaciones variantes (sgtD1cs, sgtD1del y sgtD1mut), durante cinco años de estudio de un paciente infectado crónicamente. La frecuencia relativa de las subpoblaciones se mantuvo estable a lo largo del proceso de seroconversión, permaneciendo la sgtD1del predominante durante todo el período. Esta observación no pudo ser explicada por el análisis del *fitness* replicativo desde que sgtD1del presenta un valor significativamente menor al ser comparada tanto con sgtD1cs como con sgtD1mut. Con el fin de comprender los resultados del *fitness* replicativo se evaluaron los niveles de ADN extracelular, de intermediarios replicativos y de HBeAg y HBsAg en transfecciones con cada variante y en cotransfecciones con dos variantes a evaluar. Los resultados muestran que los niveles de ADN extracelular y también la síntesis de intermediarios replicativos intracelulares de sgtD1del, fue menor comparando con los observados para las sgtD1cs y sgtD1 mut. Esta menor capacidad replicativa de la subpoblación sgtD1del está de acuerdo con su menor *fitness* replicativo observado anteriormente. Además, al comparar

los niveles de ADN en los experimentos de cotransfección sgtD1cs vs sgtD1del y sgtD1mut vs sgtD1del, notamos que la mezcla no se comporta de la misma manera en estos dos ensayos. En la cotransfección de sgtD1del con sgtD1cs se observan valores similares a los obtenidos en la transfección con sgtD1cs, mientras que en la cotransfección con sgtD1mut los valores son similares a los obtenidos en la transfección con sgtD1del. Esta diferencia es observable tanto en los niveles de ADN extracelular como intracelular. Esta observación constituye la primera evidencia del impacto biológico que resulta de la interacción entre diversos genomas replicándose en una misma célula. Hay diversas interacciones que estas variantes pueden tener en estas condiciones que podrían modificar su comportamiento y que no se detectarían en las transfecciones de estas variantes por separado. Los resultados presentados demuestran que la variante sgtD1del tiene menor *fitness* replicativo que sgtD1cs y sgtD1mut, por lo cual no puede explicar por sí mismo el comportamiento informado en el paciente. Sin embargo, el nivel de replicación a nivel celular no es el único factor que determina la selección de una variante viral específica in vivo. Otros factores, como la presión selectiva del sistema inmunológico, podrían explicar esta diferencia observada.

En un estudio reciente, donde se estimó la prevalencia de sgts en infecciones agudas y crónicas HBeAg positivas en Argentina, se observó una mayor prevalencia del sgtF1b seguido por sgtA2, sgtF4 y sgtD (Ledesma et al. 2015). Los análisis realizados en este trabajo mostraron el mismo *fitness* replicativo entre todas las combinaciones de subgenotipos, con la excepción de la cotransfección con sgtF1b-sgtF4, que presentó en la progenie un aumento de sgtF1b a expensas de sgtF4. Además, cuando se simuló ciclos seriales de infección, pudo observarse que la relación entre sgtF1b y sgtF4 se incrementó en la dirección del predominio del sgtF1b. Este resultado está en línea con la observada alta prevalencia del sgtF1b. Con el fin de analizar las diferencias observadas en los experimentos de *fitness* replicativo se evaluaron los niveles de ADN extracelular, de intermediarios replicativos y de HBeAg y HBsAg. Los resultados mostraron que sgtF1b presenta niveles significativamente más altos tanto de ADN extracelular como de intermediarios replicativos. También notamos que, aunque sgtF4 tiene un nivel de replicación más bajo, tiene una expresión de HBeAg significativamente más alta. El ARN pre-genómico y el ARNm pre-núcleo (precursor de HBeAg), se transcriben desde el mismo ORF (preC/C) pero los promotores utilizados en su síntesis son genéticamente distintos y regulados separadamente. Teniendo esto en cuenta, este resultado podría sugerir

que una de las diferencias intrínsecas entre sgtF1b y sgtF4 es la regulación de síntesis de estos dos ARNm. Mientras que el sgtF4 parece favorecer la síntesis de HBeAg, el sgtF1b favorecería la síntesis del pregenoma. Esta preferencia por la síntesis del genoma podría ser una de las explicaciones por las cuales el sgtF1b está ocupando el nicho ecológico de las nuevas infecciones en Argentina.

En resumen, se presenta un nuevo método destinado a evaluar el *fitness* replicativo del HBV. Este método permitirá profundizar el análisis de las interacciones entre diferentes variantes virales y contribuirá a la mejor comprensión de los mecanismos de selección que rigen las infecciones por el HBV. La cotransfección con sgtD1del y sgtD1mut constituye la primera evidencia del impacto en la replicación del HBV cuando dos variantes virales se replican simultáneamente en el mismo sistema celular.

Índice de contenido

Índice de tablas	xii
Índice de figuras	xiii
Introducción	3
1. Virus de hepatitis B	3
1.1. Clasificación	3
1.2. Estructura de la partícula viral	3
1.3. Ciclo de replicación del HBV	4
2. Infección por HBV	9
2.1. Infección aguda	10
2.2. Infección crónica	11
3. Mutaciones en el proceso de seroconversión	12
4. Genotipos y epidemiología	13
5. Evolución del virus de hepatitis B	14
Hipótesis y objetivos	16
Hipótesis.....	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos.....	16
Materiales y métodos	18
1. Muestras.....	18
2. Obtención de clones.....	19
a) Extracción y amplificación de ADN viral.....	19
b) Clonado	20
3. Metodología para la evaluación de <i>fitness</i> replicativo	23
4. Determinación del <i>fitness</i> replicativo de sgtD1 cepa salvaje y las cepas mutadas.....	25
5. Determinación del <i>fitness</i> replicativo entre poblaciones salvajes de los subgenotipos.....	28
5.1. Análisis de la diferencia de <i>fitness</i> entre los sgtF1b y sgtF4	30
6. Análisis de los mecanismos asociados a la diferencia de <i>fitness</i> replicativo	31
7. Test estadístico.....	34
8. Controles	34

8.1 Controles de los experimentos de <i>fitness</i>	34
8.2 Controles de <i>Southern blot</i>	34
8.3 Controles de la PCR en tiempo real.....	35
R e s u l t a d o s	37
1. Metodología para la evaluación de <i>fitness</i> replicativo	37
2. Determinación del <i>fitness</i> replicativo del sgtD1 cepa salvaje y las cepas mutadas: proceso de seroconversión	37
3. Determinación del <i>fitness</i> replicativo entre las poblaciones salvajes de los subgenotipos	39
4. Análisis de los mecanismos asociados a la diferencia de <i>fitness</i> replicativo	42
Experimento de seroconversión	42
Experimento de ocupación del nicho ecológico	45
D i s c u s i ó n	49
Determinación del <i>Fitness</i> replicativo.....	50
a) Proceso de seroconversión	51
b) Ocupación del nicho ecológico	53
Análisis de los mecanismos asociados a la diferencia del <i>fitness</i>	54
a) Proceso de seroconversión	54
b) Ocupación de nicho ecológico	56
C o n c l u s i o n e s	59
B i b l i o g r a f í a	61
A p é n d i c e s	66
1. Tablas de resultados.....	66
2. Puesta a punto y validaciones	71

Abreviaturas

AA: aminoácidos

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ALT: alanino amino transferasa.

Anti-HBc: anticuerpo anti antígeno *Core*.

Anti-HBe: anticuerpo anti antígeno e.

Anti-HBs: anticuerpo anti antígeno de superficie.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ARNpg: ARN pregenómico.

pb: pares de bases.

C: *Core*.

CC: control células.

cccADN: ADN circular covalentemente cerrado.

D-MEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco.

DS: desvío estándar.

Enh - del inglés, *enhancer*.

HCC: carcinoma hepatocelular.

HBeAg: antígeno e del HBV.

HBsAg: antígeno de superficie del HBV.

HBV: virus de hepatitis B.

h: hora.

kb: kilobase.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ORF: Marco abierto de lectura (del inglés, *Open Reading Frame*).

P: Polimerasa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *Polymerase chain reaction*).

RC-ADN: ADN relajado circular.

RFLP: Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (del inglés, *Restriction fragment length polymorphism*).

SFB: suero fetal bovino.

Índice de tablas

Tabla 1. Condiciones de amplificación del genoma entero.	19
Tabla 2. Cebadores usados para la amplificación.....	20
Tabla 3. Condiciones de amplificación de los fragmentos subgenómicos.....	26
Tabla 4. Cebadores y enzimas utilizados en el experimento del <i>fitness</i> replicativo de las mutantes.....	27
Tabla 5. Cebadores y enzimas utilizados en el experimento de <i>fitness</i> replicativo de los genotipos.....	28

Índice de figuras

Figura 1. Partículas de HBV	3
Figura 2. Formación de cccADN del HBV	4
Figura 3: Ciclo de replicación.....	5
Figura 4: ARN mensajeros de HBV	6
Figura 5: Promotor del Core.....	7
Figura 6: ORFs de HBV.....	7
Figura 7: Evolución de marcadores virales en la infección aguda.....	10
Figura 8: Evolución de marcadores virales en la infección crónica	11
Figura 9: regiones de BCP y pC.....	12
Figura 10: Distribución mundial de los genotipos	13
Figura 11: Poblaciones virales en tres tiempos de toma de muestra.....	18
Figura 12: Árbol filogenético de las variantes virales	22
Figura 13: Esquema de obtención de clones y preparación para la transfección.....	23
Figura 14: Esquema de transfección.....	24
Figura 15: Esquema del análisis de la proporción de las variantes virales en sobrenadante de cultivo	24
Figura 16: Generación del sitio de restricción de la enzima NlaIV.	25
Figura 17: Esquema del experimento del <i>fitness</i> replicativo de las mutantes.....	27
Figura 18: Esquema del experimento de <i>fitness</i> replicativo entre genotipos (D1vsF4, D1vsF1b, F1bvsF4 y A2vsF1b).....	29
Figura 19: Esquema del experimento de <i>fitness</i> replicativo entre genotipos (A2vsF4 y A2vsD1).....	29
Figura 20: Esquema del experimento de <i>fitness</i> en múltiples ciclos	30
Figura 21: Esquema de la transfección.....	31
Figura 22: Esquema de la cosecha y análisis.....	32
Figura 24: Evaluación del <i>fitness</i> de sgtD1 cepa salvaje y de las cepas mutadas	38
Figura 25: Evaluación del <i>fitness</i> replicativo entre los genotipos.....	40
Figura 26: <i>Fitness</i> replicativo en múltiples ciclos.....	41
Figura 27: Resumen de los resultados de la competición entre sgtF1b y sgtF4.....	42

Figura 28: <i>Southern blot</i> de sgtD1 cepa salvaje y de las cepas mutadas	43
Figura 29: Resultado de PCR en tiempo real de sgtD1 cepa salvaje y de las cepas mutadas	44
Figura 30: Expresión de HBeAg y HBsAg de sgtD1 cepa salvaje y de las cepas mutadas	45
Figura 31: <i>Southern blot</i> de los sgtF1b y sgtF4.....	46
Figura 32: PCR en tiempo real de sgtF1b y sgtF4.....	47
Figura 33: Expresión de los antígenos HBeAg y HBsAg de sgtF1b y sgtF4.....	47

Introducción

Introducción

1. VIRUS DE HEPATITIS B

1.1. CLASIFICACIÓN

El virus de la hepatitis B (HBV) pertenece a la familia *Hepadnaviridae*. Los miembros de esta familia son virus envueltos con genoma de ADN doble cadena, son hepatotrópicos y tienen un estrecho rango de hospedador. A su vez, esta familia está dividida en dos géneros: *Avihepadnavirus*, que infecta las aves (como patos y gansos), y *Orthohepadnavirus*, que infecta los mamíferos (como humanos, gorilas y chimpancés, entre otros) (Schaefer 2007; van Hemert et al. 2011; Seeger y Mason 2000)

1.2. ESTRUCTURA DE LA PARTÍCULA VIRAL

El HBV es un virus pequeño de aproximadamente 42nm de diámetro (partícula de Dane). Posee una nucleocápside de forma icosaédrica y una envoltura lipídica en la que se encuentran ancladas las proteínas virales de superficie. En la progenie viral también se pueden encontrar partículas defectivas filamentosas o esféricas, compuestas solamente por membrana lipídica y las proteínas de superficie (Seeger y Mason 2000) (Figura 1).

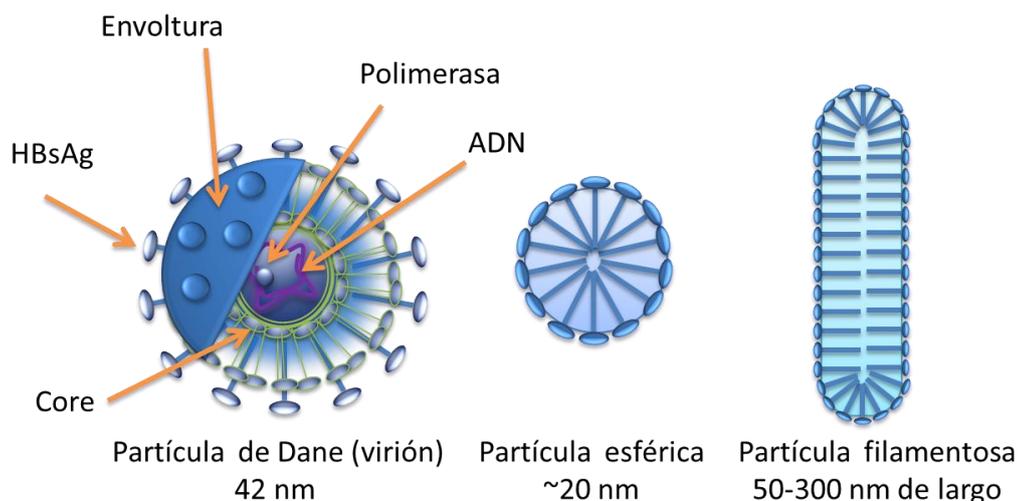


FIGURA 1. PARTÍCULAS DE HBV

Introducción

El genoma del HBV es parcialmente de doble cadena, y la cadena negativa tiene aproximadamente 3200pb de longitud. Se lo encuentra mayormente en la forma relajada circular (RC-ADN), con una de las cadenas covalentemente unida a la polimerasa viral. Dentro de la célula infectada, el RC-ADN se convierte en la forma circular covalentemente cerrada (cccADN) que después sirve como molde para la transcripción (Hao et al. 2015; Malmström et al. 2012) (Figura 2).

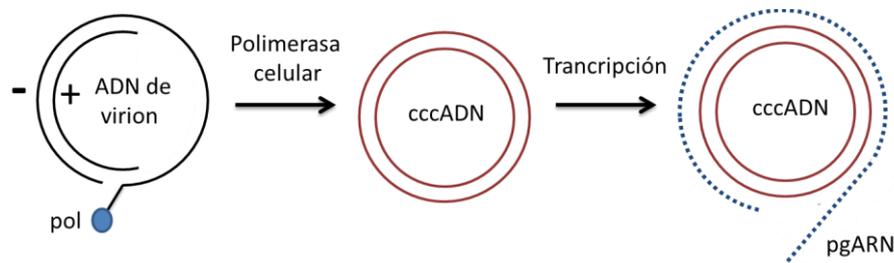


FIGURA 2. FORMACIÓN DE cccADN DEL HBV

1.3. CICLO DE REPLICACIÓN DEL HBV

El virión se une al receptor celular - NTCP (de inglés: *Na taurocholate cotransporting polypeptide*) usando las proteínas de la superficie como correceptores, y la internalización de la partícula se produce por endocitosis. La cápside se libera en el citoplasma y migra a lo largo de los microtúbulos hacia el núcleo (Tong y Revill 2016; Beck y Nassal 2007; Grimm et al. 2011).

Una vez allí, el ADN viral se libera, y es reparado por la polimerasa celular y se forma el cccADN. Todos los ARNm se sintetizan a partir de este cccADN y se exportan al citoplasma para la traducción (Tong y Revill 2016; Beck y Nassal 2007; Grimm et al. 2011) (Figura 2).

Para ensamblar la cápside viral se unen 240 unidades de la proteína C y se encapsida la polimerasa viral unida a la señal de la encapsidación ϵ presente en el pgARN. El pgARN se retrotranscribe y se sintetiza la cadena positiva incompleta. En este estado las capsides se pueden direccionar hacia la formación de viriones progenie o ser transportadas hacia en

Introducción

núcleo donde retroalimentan el ciclo, al ser utilizadas como molde para la síntesis intracelular de más cccADN (Tong y Revill 2016; Beck y Nassal 2007; Grimm et al. 2011).

Las proteínas de superficie se sintetizan en el retículo endoplasmático (ER) y se insertan en la membrana de ER, donde posteriormente se produce la brotación del HBV. Las proteínas de superficie se sintetizan en exceso y en este paso se forma un gran número de partículas subvirales que pueden salir de la célula por secreción (Tong y Revill 2016; Beck y Nassal 2007; Grimm et al. 2011) (Figura 3).

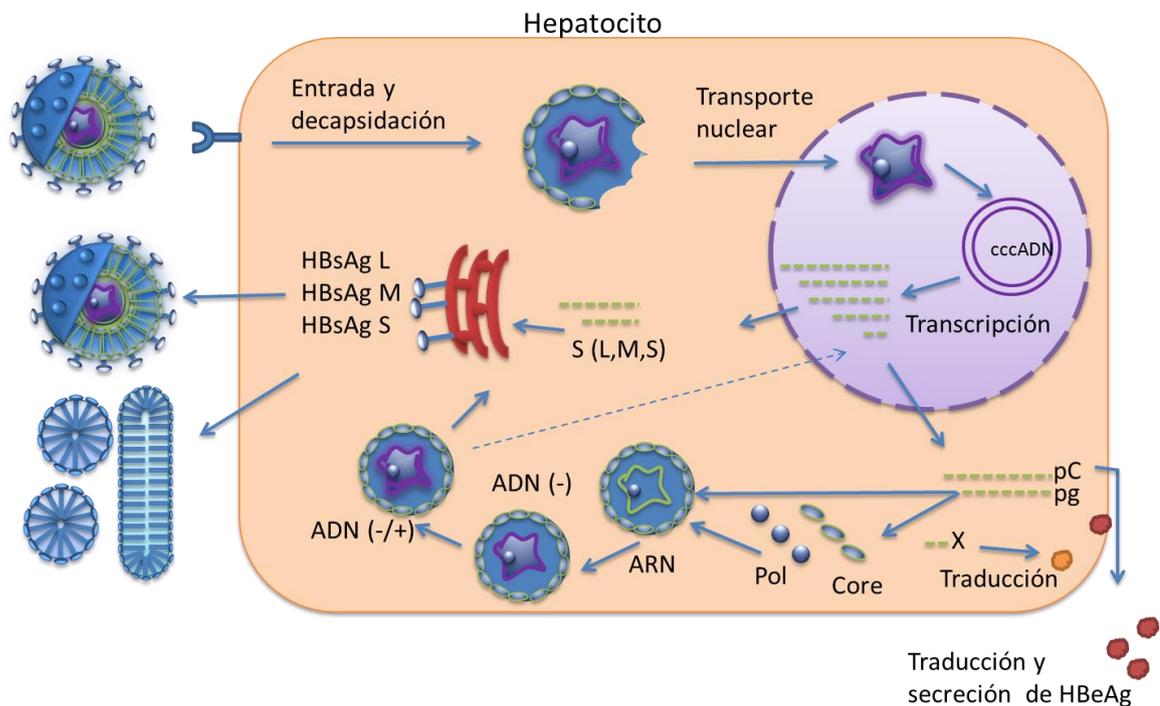


FIGURA 3: CICLO DE REPLICACIÓN

Regulación de la transcripción y traducción

Las proteínas virales son traducidas a partir de cinco ARN mensajeros (ARNm) distintos: ARN preCore de 3,5 kb (HBeAg), ARN pregenómico 3,5 kb (Core y polimerasa), y tres ARN subgenómicos: de 2,4 kb (proteína de superficie L); 2,1 kb (proteínas de superficie M y S); y de 0,7 kb (proteína X) (Qin et al. 2011; Beck y Nassal 2007; Seeger y Mason 2000) (Figura 4).

Introducción

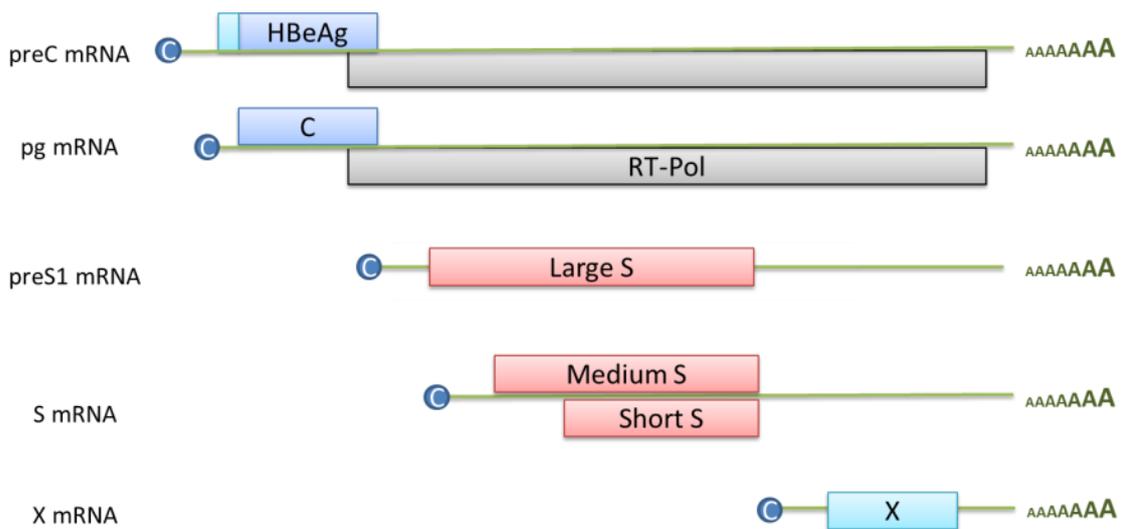


FIGURA 4: ARN MENSAJEROS DE HBV

La transcripción de los ARNs virales, de 3,5; 2,4; 2,1 y 0,7 kb, está controlada por los promotores Core, S1, S2 y X, respectivamente, y termina en un sitio de poliadenilación común. Las actividades de estos cuatro promotores están reguladas por dos elementos potenciadores (Enh - del inglés, *enhancers*): el potenciador I (EnhI) y el potenciador II (EnhII). Estos dos potenciadores muestran especificidad hepática debido a un requerimiento de factores de transcripción específicos de hígado para ejercer su función (Kramvis y Kew 1999).

Uno de los cuatro promotores virales, el promotor del Core, desempeña un papel muy importante en la replicación del virus, dirigiendo la síntesis de dos tipos de transcritos virales de 3.5 kb que difieren en sus sitios de iniciación en 5'. Por un lado, el ARN pregenómico (ARN pg), iniciado en el nt 1815, y por otro el ARNm de precore (preC) ligeramente más grande iniciado 15-35 pb corriente arriba de los sitios de inicio de ARN pg. El promotor del Core abarca una región de aproximadamente 230 pb que consiste del Promotor Basal del Core (BCP) (nt 1742-1849) y de la región reguladora (URR) (nt 1613-1742). A su vez, la URR está compuesta por dos secuencias reguladoras: el elemento regulatorio negativo (NRE, del inglés, *negative regulatory element*) y la secuencia reguladora corriente arriba del Core (CURS, del inglés, *core upstream regulator element*). El NRE reprime la activación de la transcripción mediada por BCP, mientras que CURS

Introducción

estimula la actividad de BCP. La secuencia de BCP es suficiente para la iniciación y la transcripción tanto del ARNm pC como del ARN pg (Laras et al. 2002; Sozzi et al. 2016) (Figuras 4 y 5).

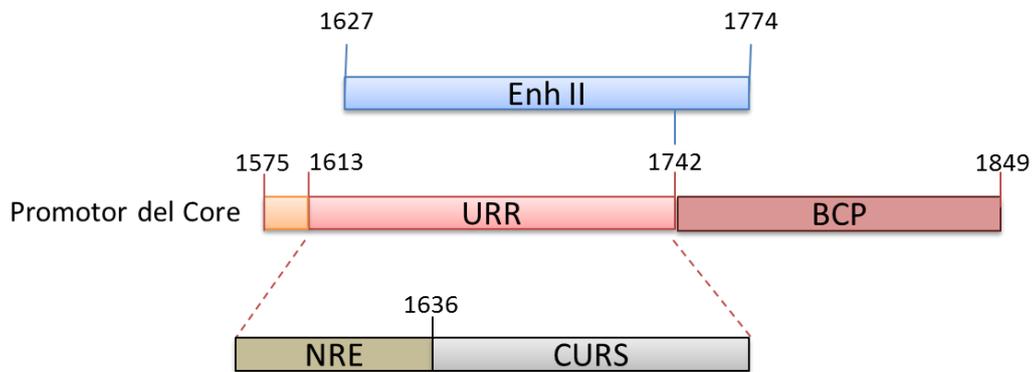


FIGURA 5: PROMOTOR DEL CORE

Expresión de las proteínas virales

El genoma viral contiene cuatro marcos abiertos de lectura (ORFs, del inglés: *Open Reading Frames*): el ORF-S (codifica tres proteínas de superficie L, M y S - del inglés, *large* (L), *middle* (M) y *small* (S)); el ORF-C (codifica la proteína de cápside (C) y la proteína preCore que da lugar al HBeAg); el ORF-X (codifica la proteína HBxAg) y el ORF-P (codifica la polimerasa viral (P), enzima con la actividad de transcriptasa reversa, RNasa H y primasa). El ORF-P abarca 80% del genoma y se superpone con los demás ORFs (Kramvis y Kew 1999; Wang et al. 2013) (Figura 6).

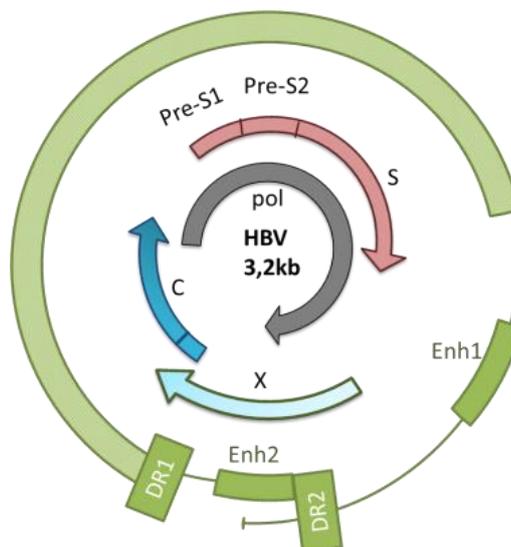


FIGURA 6: ORFs DE HBV

Introducción

ARN pg tiene función de ARNm bicistronico para la síntesis de las proteínas C y P y, por otro lado, se usa como molde para la transcripción reversa y producción de los genomas de la progenie. La proteína C consiste de 183 o 185 aminoácidos (aa), dependiendo del genotipo viral, de los cuales la secuencia N-terminal forma el dominio de ensamblaje. La secuencia C-terminal es rica en argininas y está involucrada en el empaquetamiento del complejo ribonucleoproteico compuesto por el pre-genoma y la transcriptasa reversa. Sin este dominio no ocurrirá la encapsidación del ácido nucleico (van Hemert et al. 2011; Tatematsu et al. 2009; Heermann et al. 1984; Chen 2016; Liao y Ou 1995).

El HBeAg es traducido desde el ARN preC a partir de un codón AUG corriente arriba al correspondiente a la proteína C. El HBeAg incluye la secuencia correspondiente a la proteína C a la que se adiciona una región corriente arriba de ésta; sin embargo, debido a modificaciones postraduccionales el polipéptido es más corto y posee distintas propiedades antigénicas que la proteína C. El HBeAg proteína no se requiere para la replicación viral pero su conservación durante la evolución sugiere que es funcionalmente ventajosa para el virus. Aunque no se ha determinado su función biológica exacta, puede estar implicada en la inducción de tolerancia inmune (Kramvis y Kew 1999).

El ORF-S está dividido en regiones pre-S1, pre-S2 y S. El gen que codifica para la proteína S (226 aa) constituye el extremo 3'. La proteína M (281 aa) está codificada por las regiones pre-S2 y S, y la proteína L (389 o 400 aa) por pre-S1, pre-S2 y S (Figura 3). El virión contiene proteínas S, M y L en relación 4:1:1 (van Hemert et al. 2011; Tatematsu et al. 2009; Heermann et al. 1984; Chen 2016; Liao y Ou 1995).

La proteína X (154 aa) se requiere para el establecimiento de una infección *in vivo*. Se ha demostrado que es un potente transactivador de células y genes virales. Esta proteína interacciona con factores celulares y así interfiere con la regulación de la transcripción, el ciclo celular, degradación de proteínas y apoptosis (Thomas F Baumert, Robert Thimme 2007; van Hemert et al. 2011).

Introducción

2. INFECCIÓN POR HBV

La transmisión del HBV se produce a través del contacto con sangre o fluidos corporales de una persona infectada. En zonas con alta endemicidad, con frecuencia se transmite de madre a hijo al nacer (transmisión perinatal) o por transmisión horizontal (exposición a sangre infectada), en particular de un niño infectado a un niño sano durante los primeros años de vida. Por otro lado, la transmisión del virus también puede ocurrir por contacto sexual o mediante la reutilización de agujas y jeringas, ya sea en entornos de atención médica o entre personas que usan drogas intravenosas, siendo estas las principales vías de transmisión en adultos ((WHO) 2017).

Para la prevención de la hepatitis B, existe desde 1982 una vacuna basada en HBsAg recombinante segura y eficaz. Se administra en 3 o 4 dosis y produce una respuesta de anticuerpos anti-HBs y células T de memoria. La vacunación completa induce anticuerpos que alcanzan concentraciones protectoras en más del 95% de los lactantes, niños y adultos jóvenes ((WHO) 2017).

El diagnóstico de la infección por el HBV se realiza por la detección de antígenos o anticuerpos en el suero. La combinación de la presencia o ausencia de estos marcadores permite diferenciar si un individuo es susceptible, es inmune o está infectado, y en este último caso, en qué etapa de la infección se encuentra. ((WHO) 2017).

El principal blanco celular del HBV es el hepatocito. En individuos inmunocompetentes, el HBV no posee efecto citopático y la injuria hepática se produce a través de un mecanismo inmunopatogénico. Las infecciones agudas por HBV generalmente se resuelven y no requieren un tratamiento médico. En las infecciones crónicas el objetivo del tratamiento antiviral es suprimir la replicación viral para prevenir la progresión a la cirrosis y sus complicaciones.

Introducción

2.1. INFECCIÓN AGUDA

La gran mayoría de las infecciones en adultos (~90%-95%) se resuelven luego de una etapa aguda mientras que 90% de las infecciones perinatales evolucionan a la cronicidad. Los individuos infectados pueden presentar una infección subclínica o desarrollar una infección clínica. Uno de los síntomas más típicos de la infección aguda es la ictericia, pero además se pueden observar otros como: neuralgias, mialgias, glomerulonefritis y otros trastornos debido a la formación y depósito tisular de inmunocomplejos. Durante el curso de la infección aguda se puede detectar la presencia de HBsAg, HBeAg y ADN viral, seguidos por el incremento de las transaminasas. Después de unas semanas aparecen IgM anti-HBc y anti-HBe, a la vez que los antígenos virales, el ADN y las transaminasas empiezan bajar y, al final, aparecen anticuerpos anti-HBs (Ganem y Prince 2004; Gao et al. 2015) (Figura 7).

La respuesta inmune adecuada, con anticuerpos neutralizantes, es esencial para una rápida y efectiva eliminación viral.

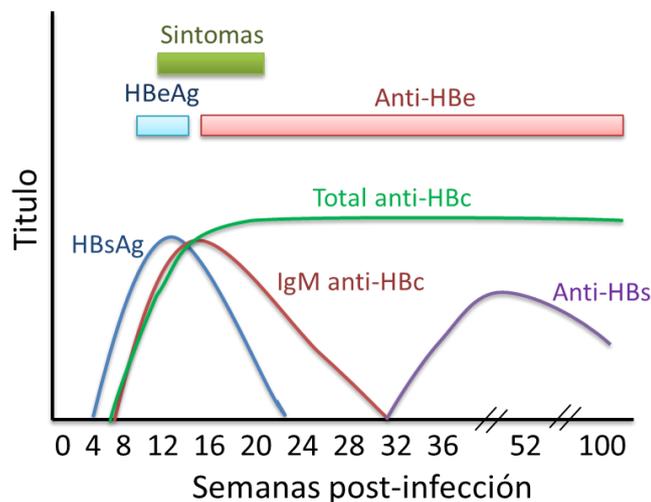


FIGURA 7: EVOLUCIÓN DE MARCADORES VIRALES EN LA INFECCIÓN AGUDA

Introducción

2.2. INFECCIÓN CRÓNICA

La infección crónica ocurre cuando el sistema inmune no alcanza eliminar la infección. Por este motivo, los niños menores de 1 año, los individuos inmunocomprometidos y aproximadamente el 5% de los adultos inmunocompetentes suelen evolucionar hacia una infección crónica (Gao et al. 2015; Ganem y Prince 2004).

La infección crónica por el HBV se define por la persistencia del HBsAg en el suero de un individuo durante al menos 6 meses. Durante el curso de la infección crónica, el HBV evoluciona desde una etapa con elevada replicación viral, transaminasas altas y presencia del HBeAg hacia una etapa de bajo nivel de replicación viral, transaminasas normales o bajas y con presencia de anticuerpos antiHBe. Este proceso, desde la etapa HBeAg a la antiHBe, se denomina seroconversión y es un evento clave en la historia natural de la hepatitis crónica (Gao et al. 2015; Ganem y Prince 2004) (Figura 8).

En aproximadamente 90% de los pacientes crónicamente infectados por HBV se produce la seroconversión del HBeAg y se convierten en portadores inactivos. El restante 10% cursa una hepatitis crónica activa, con mayor riesgo de desarrollo de cirrosis, cáncer de hígado o carcinoma hepatocelular (HCC) (Gao et al. 2015; Ganem y Prince 2004).

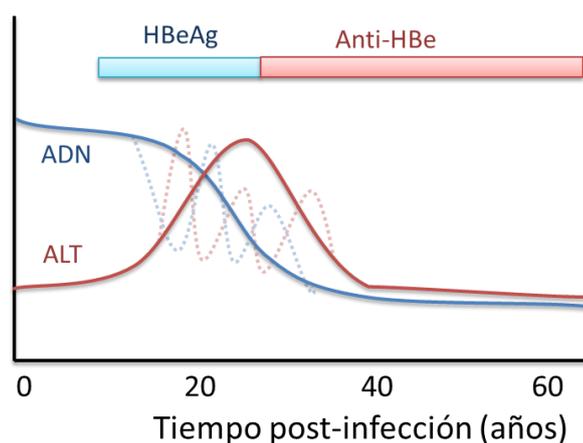


FIGURA 8: EVOLUCIÓN DE MARCADORES VIRALES EN LA INFECCIÓN CRÓNICA

Introducción

3. MUTACIONES EN EL PROCESO DE SEROCONVERSIÓN

El HBV es un virus con genoma de ADN, sin embargo como la polimerasa viral carece de la actividad *proofreading*, la frecuencia de incorporación de nucleótidos erróneos es comparable con la de los virus de ARN. Sin embargo, este virus tiene solapamiento de los cuatro marcos de lectura, lo que representa una fuerte restricción evolutiva que limita la tasa a la cual se produce la fijación de esas mutaciones (Park 2015; Jammeh et al. 2008).

Durante el proceso de seroconversión se pueden detectar a nivel molecular mutaciones en las regiones del promotor basal del core (BCP) y del precore (pC) del genoma viral (Park 2015; Jammeh et al. 2008) (Figura 9).

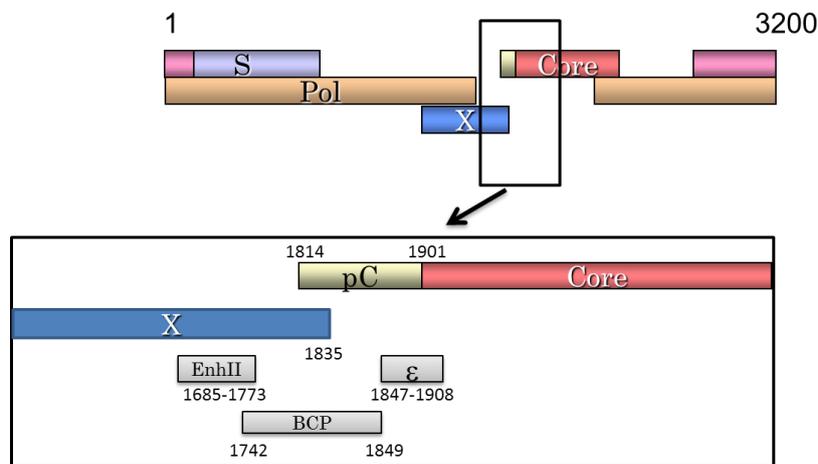


FIGURA 9: REGIONES DE BCP Y PC

Se ha descrito que la transcripción del pgARN y del ARN pC está regulada por factores de transcripción que se unen a la región de *enhancer* II y del BCP. Por lo tanto, mutaciones en estas regiones del genoma podrían afectar los niveles de replicación y/o la expresión de proteínas virales (Fischer et al. 2006).

Las mutaciones más comunes en la región BCP son A1762T, G1764A, y en menor medida T1753C, T1773C y C1766T. También ha sido descrito que la delección entre las posiciones 1763-1770, donde se encuentra la región de *enhancer* II y del BCP, suele estar asociada a baja producción de las proteínas virales (Park 2015; Jammeh et al. 2008).

Con respecto a la región preCore, la mutación G1896A es la encontrada en mayor frecuencia; esta convierte al codón 28 (TGG-triptófano) en un codón de STOP (TAG) y frena la producción del HBeAg (Park 2015; Jammeh et al. 2008).

Introducción

4. GENOTIPOS Y EPIDEMIOLOGIA

La infección por el HBV es un importante problema de salud global. Se estima que más de 2 mil millones de personas han sido infectadas. De estas, aproximadamente 257 millones permanecen crónicamente infectadas y en mayor riesgo de progresar hacia formas de mayor gravedad clínica. La cirrosis o el HCC relacionados a la infección por HBV causan aproximadamente 887 000 muertes cada año en todo el mundo. ((WHO) 2017)

El HBV está dividido en 10 genotipos (A-J), en base a una divergencia nucleotídica entre grupos mayor al 7,5%, que a su vez se encuentran subdivididos en numerosos subgenotipos. Los genotipos muestran una distribución geográfica característica. El genotipo A es prevalente en África y Europa; los genotipos B y C en Asia y el genotipo E en África subsahariana. Los genotipos F y H se encuentran mayormente en América central y del sur, mientras que el genotipo D está distribuido en todo el mundo (Kao 2011; Shi et al. 2013; Kramvis et al. 2010) (Figura 10).

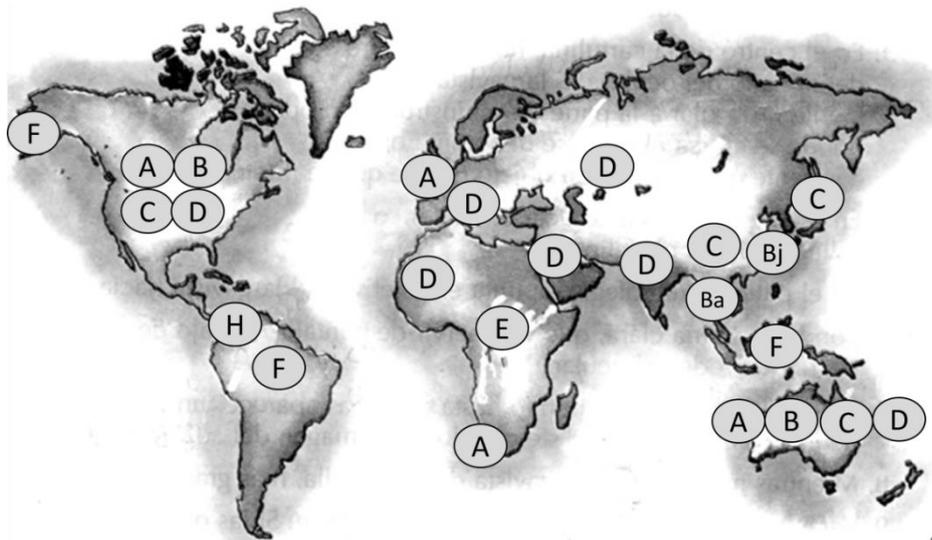


FIGURA 10: DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE LOS GENOTIPOS
(Adaptado de Fung y col. 2004)

En Argentina, Gonzalez Lopez Ledesma y col (2015) han realizado un estudio en pacientes con infección crónica HBeAg positiva y anti-HBe. Los resultados muestran que la mayoría de las infecciones crónicas HBeAg positivas son causadas por el subgenotipo F1b (42,9%), seguido por A2 (23,8%), F4 (19,0%) y D (9,5%). En cambio, las infecciones crónicas HBeAg negativas presentan un patrón diferente, con D como el genotipo más prevalente (40,0%), seguido por F4 (21,0%), F1b (15,2%) y A2 (14,3%). Por lo tanto, se postula que

Introducción

en nuestro país la prevalencia del sgt F1b está en aumento, fundamentalmente a expensas del gtD y permaneciendo en porcentajes estables los sgts A2 y F4 (Gonzalez Lopez Ledesma et al. 2015).

En el mismo estudio, se evidenció que cada sgt viral presenta mutantes características, asociadas a la seroconversión, en distintas regiones del genoma: el sgt F1b presentó alta prevalencia de mutaciones en la región del BCP, mientras que en el gt D estas mutaciones fueron menos prevalentes y se observó una alta frecuencia de mutaciones en el pC (Gonzalez Lopez Ledesma et al. 2015).

5. EVOLUCIÓN DEL VIRUS DE HEPATITIS B

El HBV presenta una alta tasa de mutación y como consecuencia el virus circula como una población de variantes genéticas estrechamente relacionadas entre sí pero no idénticas, denominada cuasiespecie. La evolución de la población viral, ya sea en la infección en un mismo paciente o en una población de individuos, resulta de un complejo equilibrio que depende de factores tanto virales como del hospedador. Las poblaciones virales están sometidas a un proceso continuo de generación de nuevas variantes, competencia y selección. Como resultado de este proceso evolutivo, se establece aquella subpoblación viral (mutante o (sub)genotipo) que presente el mayor *fitness* en un entorno dado (Andino y Domingo 2015; Domingo y Gomez 2007).

El *fitness* viral es una medida relativa de la capacidad de una variante viral para adaptarse a un entorno específico. La evaluación del *fitness* de una variante viral dada es de gran importancia para comprender la emergencia o la eliminación de esa variante en un microambiente particular. Existen muchos parámetros que pueden influir el *fitness in vivo*, como el sistema inmune o el perfil genético del hospedador, que no pueden integrarse al estudio de *fitness in vitro*. La selección de un buen modelo animal o de un sistema de cultivo celular donde sea posible producir una infección completa, es muy importante para la evaluación de *fitness*. Sin embargo y a diferencia de muchos otros virus, el HBV no tiene un sistema de cultivo celular que permita una infección *in vitro* y pasajes del virus, lo que constituye una fuerte restricción para la evaluación del *fitness*. En la actualidad, sistemas de transfección se utilizan ampliamente para suplir la infección *in vitro* y así lograr la evaluación de diferentes variantes del HBV.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS

La fijación de mutaciones durante la infección crónica por el HBV (evolución intrahospedador/proceso de seroconversión) o bien la frecuencia diferencial de los genotipos virales presentes en la población infectada (evolución interhospedadores/ocupación del nicho en la población de hospedadores susceptibles) podrían estar mediadas, en parte, por una ventaja selectiva a nivel de la replicación de las variantes virales a nivel celular. Por lo tanto, la evaluación del *fitness* replicativo de las diferentes variantes que emergen durante la infección crónica o de los distintos genotipos virales, permitirá evaluar las bases moleculares de la evolución de distintas variantes del HBV en el establecimiento y progresión de la infección.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las bases moleculares de la evolución del HBV en el establecimiento y progresión de la infección crónica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar una metodología que permita evaluar el *fitness* a nivel celular (*fitness* replicativo) de distintas poblaciones del HBV
2. 1. Determinar el *fitness* replicativo de las poblaciones mutantes emergentes (BCP y pC) durante la infección crónica respecto al de las poblaciones salvajes de las que provienen.
2. 2. Determinar el *fitness* replicativo entre las poblaciones salvajes de los sub genotipos F1b, F4, A2 y D1 como partícipes de la infección de la población de hospedadores susceptibles.
3. Analizar mecanismos asociados a la diferencia de *fitness* replicativo.

Materiales y métodos

Materiales y métodos

1. MUESTRAS

Para estudiar las bases moleculares de la evolución del HBV en dos escenarios evolutivos, como ser la seroconversión y la ocupación de nicho ecológico, se analizaron variantes que circulan en forma natural en individuos infectados con HBV.

Para el estudio de las bases moleculares del proceso de seroconversión, se seleccionaron muestras provenientes del trabajo publicado por Sede y col. (2013), en el que se realizó durante 5 años el seguimiento de las variantes virales circulantes en un individuo infectado por HBV sgtD1 en forma crónica. Estas variantes correspondieron a: sgtD1 cepa salvaje (sgtD1cs), sgtD1 con la mutación G1896A (sgtD1mut) y sgtD1 con la delección 1763-1770 (sgtD1del). La frecuencia relativa de dichas poblaciones se mantiene similar a través del tiempo de infección analizado y, curiosamente, la HBVdel es la más prevalente (Sede et al. 2014) (Figura 11).

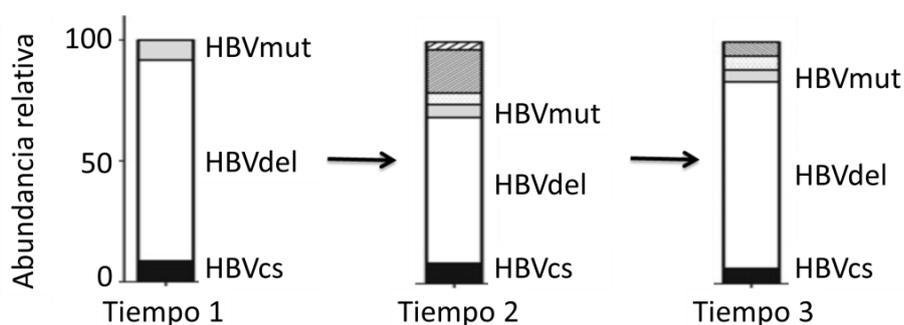


FIGURA 11: POBLACIONES VIRALES EN TRES TIEMPOS DE TOMA DE MUESTRA

(Adaptado de Sede y col. 2013)

Para el estudio de ocupación de nicho ecológico por distintos genotipos del HBV se seleccionaron muestras de individuos infectados por los (sub)genotipos más prevalentes en la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. Los resultados del trabajo publicado por Gonzalez Lopez Ledesma et al (2015) muestran que la mayoría de las infecciones crónicas HBeAg positivas en Argentina son causadas por el subgenotipo F1b (42,9%), seguido por A2 (23,8%), F4 (19,0%) y D (9,5%). Por ello, las variantes seleccionadas para este trabajo fueron las cepas salvajes de sgtD1, sgtF1b, sgtF4, sgtA2 (Gonzalez Lopez Ledesma et al. 2015).

Materiales y métodos

Este trabajo de Tesis se enmarca en el proyecto denominado “Evolución de los virus de las hepatitis B y C en las infecciones agudas y crónicas” aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, EXP-UBA:0069893/14

2. OBTENCIÓN DE CLONES

Obtención de clones de cada variante viral para:

Objetivo 2.1 sgtD1cs, sgtD1mut y sgtD1del

Objetivo 2.2 sgtF1b, sgtF4, sgtA2

A) EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN VIRAL

Las variantes analizadas en el presente trabajo fueron obtenidas directamente de pacientes con infección por HBV que han sido previamente caracterizados en relación a: genotipo viral (análisis filogenético) y mutaciones y/o deleciones en las regiones BCP y pC (análisis directo de las secuencias genómicas). El ADN viral se extrajo a partir de 200 µL de suero mediante el método de digestión con proteinasa K, extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol.

A partir del ADN extraído se amplificó el genoma entero del HBV utilizando la polimerasa Hi Fidelity y cebadores que contienen sitios de restricción para la enzima BspQI para su posterior clonación (Tablas 1 y 2).

TABLA 1. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA ENTERO.

	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	1
	94°C	40 segundos	
	59°C	1 minutos	10
	68°C	3 minutos	
	94°C	40 segundos	
	59°C	1 minutos	10
	68°C	5 minutos	
	94°C	40 segundos	
	61°C	1 minutos	10
	68°C	7 minutos	
	94°C	40 segundos	
	61°C	1 minutos	10
	68°C	9 minutos	
Extensión final	68°C	15 minutos	1

Materiales y métodos

TABLA 2. CEBADORES USADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN

Cebador	Dirección	Secuencia	Posición	Enzima de restricción
HBVs	Sentido	CCGGAAAGCTTAT <u>GCTCTTCTTTTC</u> ACCTAATCATC	1821-1843	BspQI (Subrayado Sitio de restricción)
HBVas	Anti sentido	CCGGAGAGCTCAT <u>GCTCTTCAAAAA</u> GTTGCATGGTGCTGGTG	1825-1804	BspQI (Subrayado Sitio de restricción)
HBV1	Sentido	GTCAACGACCGACCTTGAGGC	1684-1704	-
HBV2	Anti sentido	TGAACAGACCAATTTATGCCTACAGC CTCC	1805-1776	-
HBV3	Sentido	ATGGAGACCACCGTGAACGC	1608-1627	-
HBV4	Anti sentido	AATTCTTTATAAGGATCAATGTCCAG <u>GCCC</u>	1926-1897	NlaIV (Subrayado Sitio de restricción parcial)
HBV5	Sentido	CTGTGCCAAGTGTTTGCTGA	1171-1190	-
HBV6	Sentido	CTGCTGGTGGCTCCAGTTC	57-75	-
HBV7	Anti sentido	AACGCCGCAGACACATCCA	391-373	-
HBV8	Sentido	ATTTTACGGGACTCTATTCCTC	2479-2500	-
HBV9	Anti sentido	GGGACTCAAGATGYTGYACAG	789-769	-

B) CLONADO

- Aislamiento de los clones de cada variante viral

Dado que el ADN viral extraído de cada paciente contiene una mezcla compleja de poblaciones virales, se procedió al aislamiento y clonado a fin de obtener y purificar variantes individuales. Los amplicones obtenidos se purificaron mediante columnas comerciales (QIAGEN) y se ligaron a 4°C al vector PUC-19 y usando la ligasa T4 (Promega).

El ligado se clonó transformando células competentes DH10β (cepa de células E. coli) siguiendo el siguiente protocolo: 50 μL de las células competentes se mezcló con 5 μL de

Materiales y métodos

ligado y se dejó en hielo durante 30 min. Después se colocó en un baño de agua durante 75 segundos a 42°C y se dejó en hielo 2 minutos más. Se agregó 1 ml de medio líquido a cada tubo y se dejó en agitación a 37°C durante 2 horas. Finalmente se centrifugó y se plaqueó en las placas de LB-Agar que contenían IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopranosid), Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolil- β -D-galactopiranosid) y ampicilina. Las placas se incubaron durante la noche a 37°C y el día siguiente se aislaron las colonias blancas.

Las colonias aisladas se crecieron en medio líquido. Se realizó la amplificación del genoma viral de cada colonia crecida usando el protocolo de amplificación de genoma entero adaptado (tabla 3) y se analizó en un gel de agarosa al 1,5% para seleccionar aquellas colonias que contienen el inserto de 3200 pb (Apéndices 2a). Las colonias que contenían el genoma entero se guardaron en medio líquido con glicerol a -20°C (Figura 13).

- Tamizaje para determinar las variantes virales

Se realizó la caracterización de cada clon en relación a la presencia de mutaciones en las regiones del BCP y pC.

De cada población viral clonada (sgtD1cs, sgtD1mut, sgtD1del, sgtF1b, sgtF4, sgtA2) se conservaron entre 10 y 20 clones (Figura 13).

Todas las cepas (salvajes y mutantes) se confirmaron por secuenciación directa y análisis filogenético de la mezcla de clones que se usó posteriormente para la transfección. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos GenBank bajo los siguientes números de acceso: KY382410-KY382415.

Para el análisis filogenético, las secuencias obtenidas en este trabajo junto a secuencias de referencia disponibles en la base de datos GenBank fueron alineadas con el programa ClustalX v2.05 y editadas con el programa BioEdit v7.0.9.0. Se estimó el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica usando el programa jModeltest v2.1 siguiendo el criterio de información Akaike. El análisis filogenético se realizó por el método de Máxima verosimilitud implementado en el programa PhyML v3.0 y se hizo un análisis de remuestreo (*bootstrapping*) de 100 pseudorélicas para evaluar el soporte de los agrupamientos filogenéticos (Figura 12).

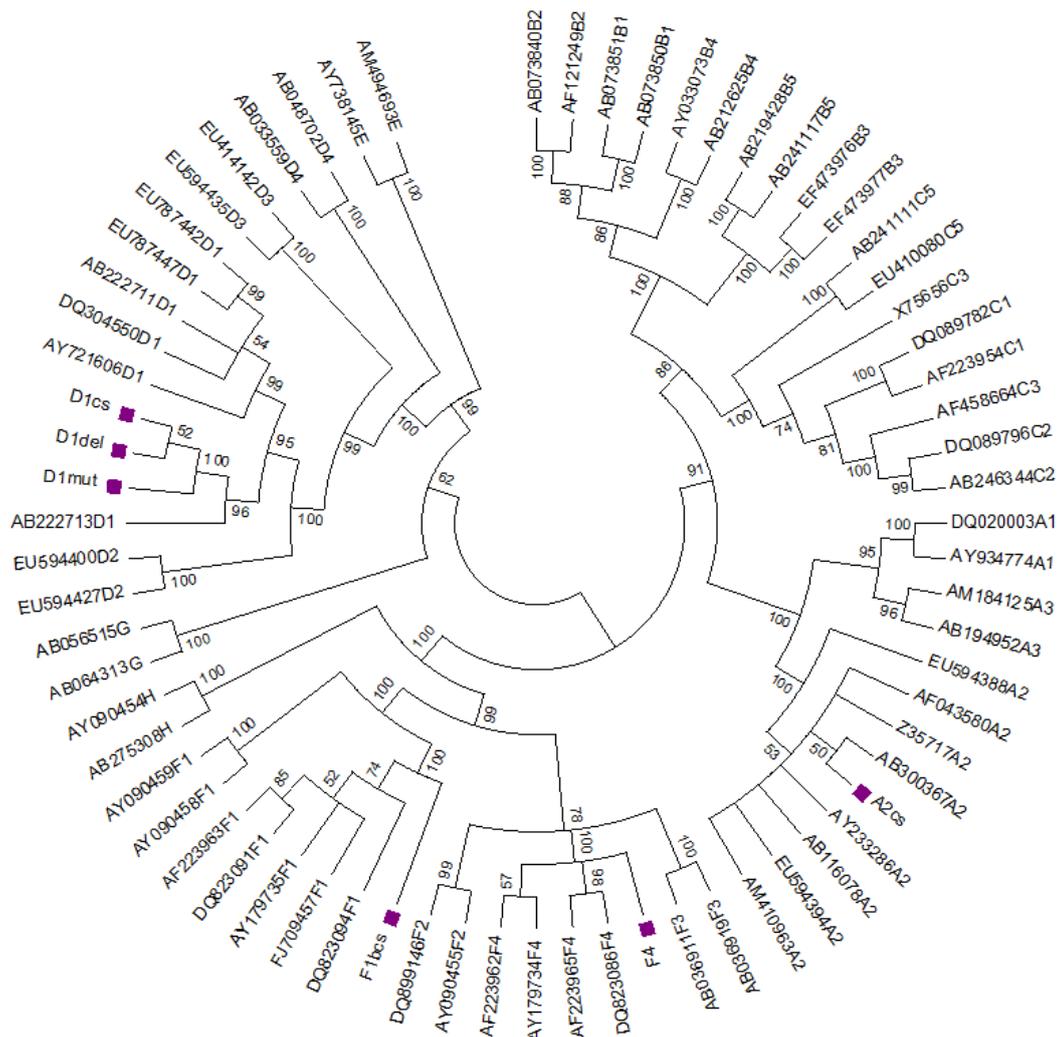


FIGURA 12: ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LAS VARIANTES VIRALES

- Preparación de las muestras para la transfección

Se realizó una mezcla de clones a fin de obtener una variabilidad representativa de cada una de las poblaciones virales a ensayar. Estos se cultivaron en medio líquido y se extrajo el ADN. Brevemente, se centrifugaron las bacterias y se resuspendió el pellet en la solución de resuspensión (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl en pH=7,5 y 100 µg/ml de RNasa A). Se adicionó la solución de lisis (0,2 M NaOH, 1% SDS), se mezcló y se agregó la solución de neutralización (1,32 M Acetato de Potasio pH=4,8). El ADN se precipitó con isopropanol y centrifugación, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en agua.

Materiales y métodos

El ADN extraído se digirió con la enzima BspQI para liberar el genoma del HBV del vector PUC-19. El producto de la restricción se analizó en un gel de agarosa al 1,5% y los fragmentos de ADN con tamaño de 3200 pb, que se corresponden con el tamaño del genoma viral, se extrajeron y purificaron de gel con columnas comerciales (QIAGEN, Alemania). El ADN se cuantificó y guardó a -20°C para su uso posterior (Figura 13).

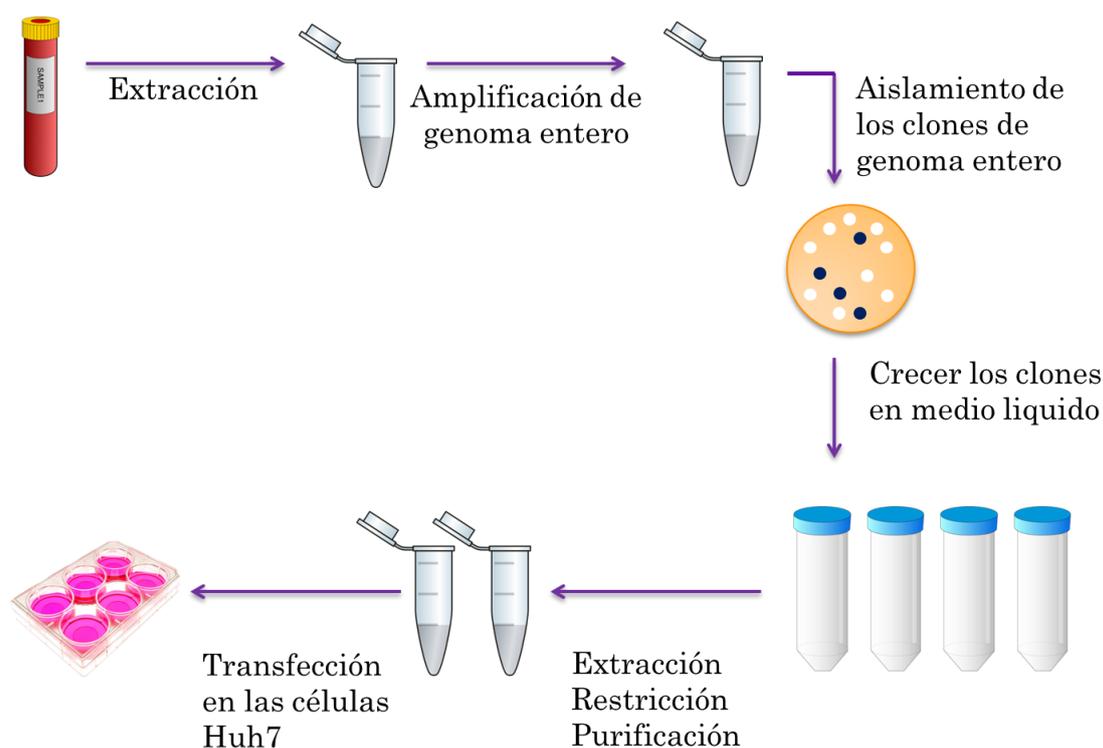


FIGURA 13: ESQUEMA DE OBTENCIÓN DE CLONES Y PREPARACIÓN PARA LA TRANSFECCIÓN

3. METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE *FITNESS* REPLICATIVO

Se utilizó la línea celular continua Huh7 derivada de hepatocarcinoma humano (Nakabayashi 1982). Se cultivó con medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM, GIBCO, N° de catálogo: 12100-061) suplementado con 2,25 g/L NaHCO₃ y 10 % de Suero fetal bovino - SFB (PAA) a 37 °C y 5 % CO₂. Como medio de infección se utilizó el mismo medio suplementado con 2 % de SFB.

Se crecieron células Huh7 en placas de 6 pocillos hasta 70-80% de confluencia y se transfectaron con 1µg de la mezcla de ADN (0,5 µg de cada variante confrontada) usando

Materiales y métodos

X-tremeGENE9 (Roche) siguiendo las instrucciones de fabricante para la relación 3:1. Las células se incubaron durante 96 hs en medio de infección a 37°C. Se realizaron lavados cada 24 hs para eliminar el ADN proveniente de la transfección (Apéndice 2c). A las 96 hs posttransfección se cosechó el sobrenadante de cultivo (Figura 14).

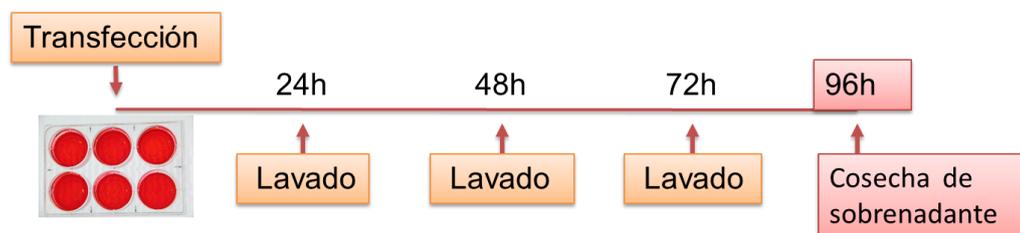


FIGURA 14: ESQUEMA DE TRANSFECCIÓN

Luego se realizó la extracción de ADN a partir del sobrenadante de cultivo mediante el kit comercial High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) y el ADN obtenido se amplificó por PCR (Materiales y Métodos, secciones 4 y 5). Finalmente, para la determinación de la proporción de las variantes se realizó el clonado molecular, se seleccionaron al azar 20 colonias, se amplificaron mediante PCR y se analizaron mediante RFLP (Figura 15 y apéndice 2b).

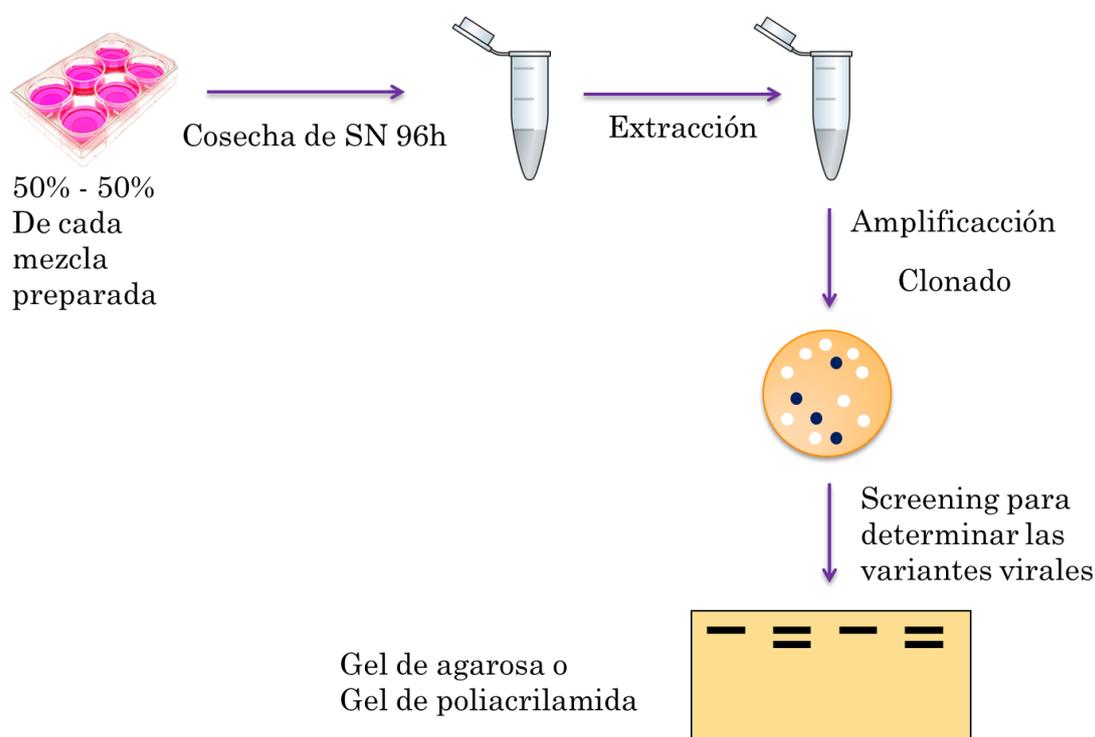


FIGURA 15: ESQUEMA DEL ANÁLISIS DE LA PROPORCIÓN DE LAS VARIANTES VIRALES EN SOBRENADANTE DE CULTIVO

Materiales y métodos

4. DETERMINACIÓN DEL *FITNESS* REPLICATIVO DE sgtD1 CEPA SALVAJE Y LAS CEPAS MUTADAS

En este trabajo, se determinó el *fitness* replicativo *in vitro* de cada una de las siguientes poblaciones virales: sgtD1cs, sgtD1mut y sgtD1del. Para ello se realizó la transfección de las mezclas de clones en células Huh7. Cada experimento se hizo por sextuplicado confrontando las combinaciones de la cepa salvaje y las cepas mutadas en relación 50%-50% (sgtD1cs vs sgtD1mut, sgtD1cs vs sgtD1del, sgtD1mut vs sgtD1del).

La transfección y el clonado se realizaron como se describió anteriormente.

Para el experimento sgtD1cs vs sgtD1mut se introdujo una parte del sitio de restricción para la enzima NlaIV en el cebador antisentido (Tabla 2). Este cebador tiene solo 5 de los 6 nucleótidos del sitio de restricción. El último nucleótido del sitio de restricción se obtiene luego de la extensión del cebador, durante la etapa de amplificación sólo si la secuencia es salvaje. Así, considerando que la cepa salvaje tiene una G en la posición 1896, se va a formar el sitio de restricción entero (G+GGGCC). En el caso de la cepa mutada la secuencia generada (A+GGGCC) no será reconocible por la enzima NlaIV (Figura 16).

Variante viral	Secuencia del amplicon	Secuencia del cebador (HBV4)	Resultado de la amplificación
sgtD1 cs	...GGCTTT G	GGGCC TGGA...	Sitio de restricción entero (NlaIV)
sgtD1mut	...GGCTTT A	GGGCC TGGA...	No se genera el sitio de restricción entero (NlaIV)
	Posición 1896: cs - G mut - A		

FIGURA 16: GENERACIÓN DEL SITIO DE RESTRICCIÓN DE LA ENZIMA NIAIV.

Para determinar la presencia de la mutación G1896A se realizó una amplificación de la región BCP/pC (319 pb) de cada uno de los clones obtenidos y el fragmento se digirió con la enzima NlaIV cuyo sitio de corte se encuentra entre los nucleótidos 291 y 292. El producto de digestión se analizó en gel de agarosa al 3% para visualizar la diferencia de 28 nucleótidos entre el producto amplificado cortado (sin mutación G1896A) y sin cortar (con mutación G1896A) (Figura 14, tablas 2, 3 y 4 y apéndice 2e y 2f).

Materiales y métodos

Para facilitar la visualización de la diferencia en tamaño de bandas, en cada calle del gel se corrió el mismo amplicón sin cortar con la enzima y el cortado (Figura 17).

TABLA 3. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE LOS FRAGMENTOS SUBGENÓMICOS.

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94 ⁰ C	5 minutos	1
	94 ⁰ C	30 segundos	
	53 ⁰ C (56 ⁰ C para HBV6-HBV9; 58 ⁰ C para HBV1-HBV2)	30 segundos	30
	72 ⁰ C	30 segundos	
Extensión final	72 ⁰ C	5 minutos	1

En los experimentos sgtD1cs vs sgtD1del y sgtD1mut vs sgtD1del, para determinar la frecuencia de las variantes en la progenie, se realizó una PCR de 121 pb y los productos de amplificación fueron resueltos en un gel de poliacrilamida al 15%, a fin de visualizar la diferencia entre los fragmentos esperados para la variante sin (121 pb) y con delección (113 pb) (Figura 17, tablas 1, 3 y 4 y apéndice 2e y 2f).

Considerando la dificultad para diferenciar estos fragmentos, para mejorar la visualización se hizo la siguiente serie de pasos:

-Cada amplicon se corrió en un gel de agarosa a 2% para seleccionar solo los amplicones positivos.

-Cada amplicon positivo se mezcló con un marcador de 121 pb y se corrió esta mezcla en el gel de poliacrilamida en la manera previamente descrita. La determinación se realizó de esta manera debido a que resultaba más sencillo visualizar la presencia de doble banda (121 pb+113 pb) o simple banda (121 pb+121 pb) que visualizar la diferencia entre los tamaños de las bandas.

Finalmente, las diferencias en las frecuencias entre las variantes se evaluaron usando el test de Fisher (ver sección 7. Test estadístico).

Materiales y métodos

TABLA 4. CEBADORES Y ENZIMAS UTILIZADOS EN EL EXPERIMENTO DEL *FITNESS* REPLICATIVO DE LAS MUTANTES.

Variantes virales confrontadas	Tamaño del fragmento amplificado	Enzima de restricción	Tamaño esperado de los fragmentos (Patrón de RFLP)
sgtD1cs + sgtD1mut	320 pb	NlaIV	sgtD1cs: 290 pb + 30 pb sgtD1mut: 320 pb
sgtD1cs + sgtD1del	121pb o 113 pb	-	sgtD1cs: 121pb sgtD1del: 113 pb
sgtD1mut + sgtD1del	121pb o 113 pb	-	sgtD1mut: 121pb sgtD1del: 113 pb

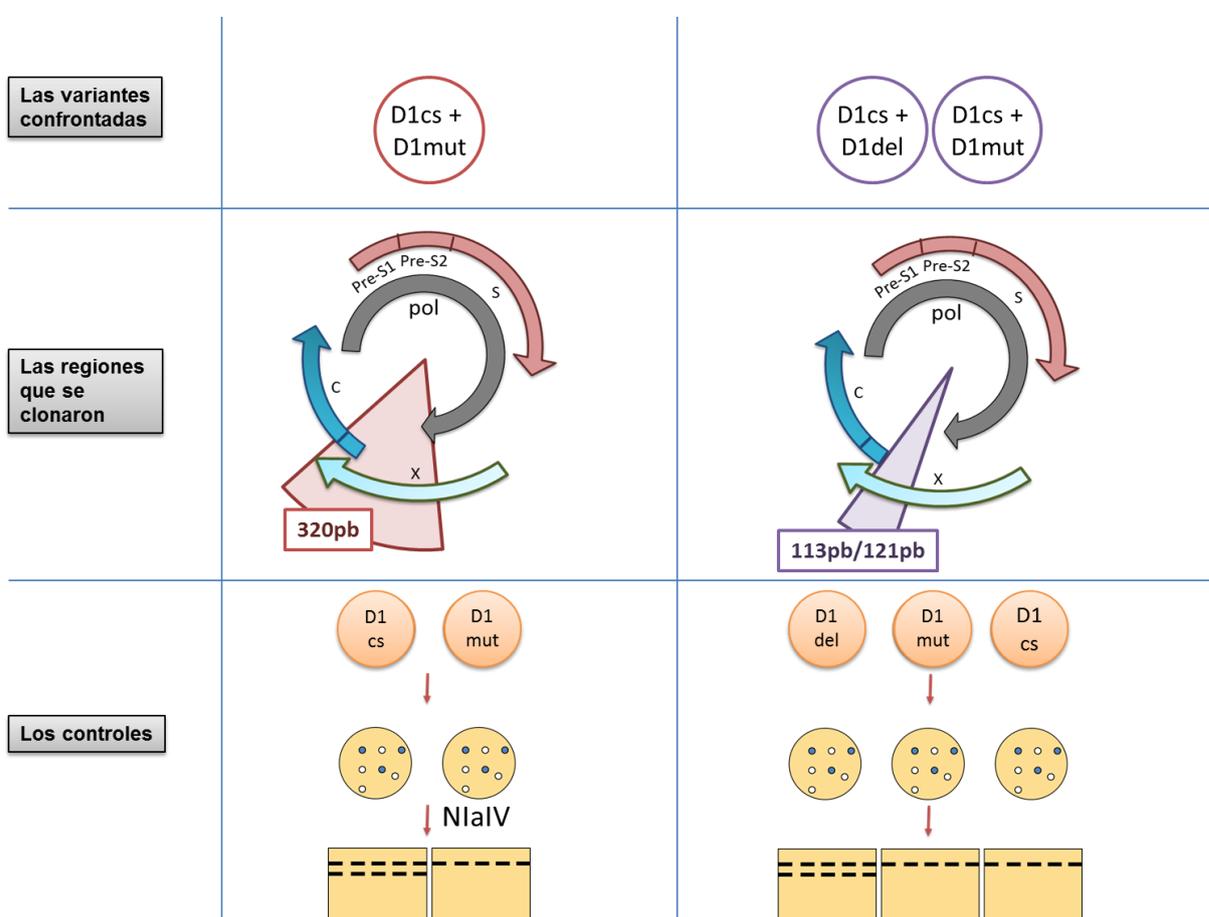


FIGURA 17: ESQUEMA DEL EXPERIMENTO DEL *FITNESS* REPLICATIVO DE LAS MUTANTES.

En la figura se muestran las variantes virales confrontadas, las regiones del genoma que se utilizaron para la clonación y los patrones de RFLP esperados (Los controles)

Materiales y métodos

5. DETERMINACIÓN DEL *FITNESS* REPLICATIVO ENTRE POBLACIONES SALVAJES DE LOS SUBGENOTIPOS

Para evaluar el *fitness* replicativo entre los subgenotipos se cotransfectaron las células Huh7 usando mezclas de clones. Cada experimento se hizo por sextuplicado confrontando las combinaciones de los genotipos en relación 50%-50% (F1b vs F4, F1b vs A2, F1b vs D1, F4 vs A2, F4 vs D1 y A2 vs D1).

El clonado y la transfección se realizaron como se describió anteriormente.

Determinación de la frecuencia de genotipos en la progenie viral por PCR RFLP

Las colonias se aislaron y se amplificaron por PCR diferentes regiones del genoma, dependiendo de la combinación de los genotipos que se transfectaron. Se realizó la digestión del fragmento de PCR con enzimas de restricción y se analizaron mediante un gel de agarosa de 1,5% para visualizar los patrones de RFLP entre los genotipos (Figuras 18 y 19, tablas 2, 3 y 5 y apéndice 2e y 2f).

Para facilitar la visualización de la diferencia en tamaño de bandas, en cada calle del gel se corrió el mismo amplicon sin cortar con la enzima y el cortado

Las diferencias en las frecuencias entre los genotipos se evaluaron usando test de Fisher.

TABLA 5. CEBADORES Y ENZIMAS UTILIZADOS EN EL EXPERIMENTO DE *FITNESS* REPLICATIVO DE LOS GENOTIPOS.

Variantes virales confrontadas	Tamaño del fragmento amplificado	Enzima de restricción	Tamaño esperado de los fragmentos (Patron de RFLP)
sgtD1 + sgtF4	334 pb	XhoI	sgtD1: 264 pb + 70 pb sgtF4: 334 pb
sgtD1 + sgtF1b	334 pb	XhoI	sgtD1: 264 pb + 70 pb sgtF1b: 334 pb
sgtF1b + sgtF4	631 pb	HindIII	sgtF1b: 463 pb + 168 pb sgtF4: 631 pb
sgtA2 + sgtF1b	631 pb	HindIII	sgtF1b: 463 pb + 168 pb sgtA2: 631 pb
sgtA2 + sgtF4	762 pb	SmaI	sgtF4: 497 pb + 265 pb sgtA2: 762 pb
sgtA2 + sgtD1	1130 pb	EcoRI	sgtA2: 721 pb + 409 pb sgtD1: 1130 pb

Materiales y métodos

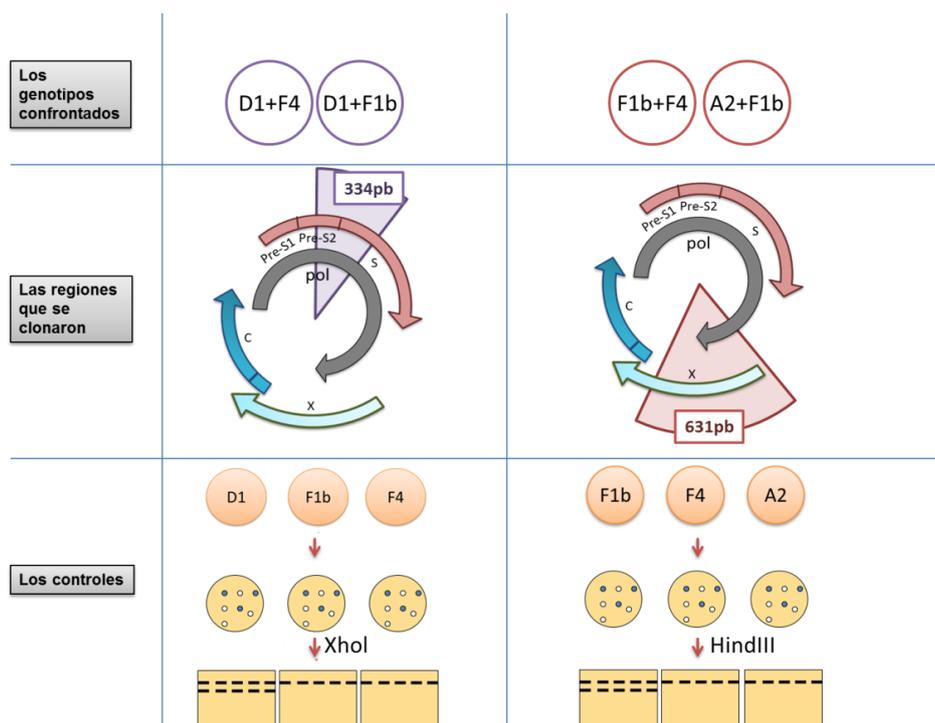


FIGURA 18: ESQUEMA DEL EXPERIMENTO DE *FITNESS* REPLICATIVO ENTRE GENOTIPOS (D1VSF4, D1VSF1B, F1BVSF4 Y A2VSF1B).

En la figura se muestran las variantes virales confrontadas, las regiones del genoma que se utilizaron para la clonación y los patrones de RFLP esperados (Los controles)

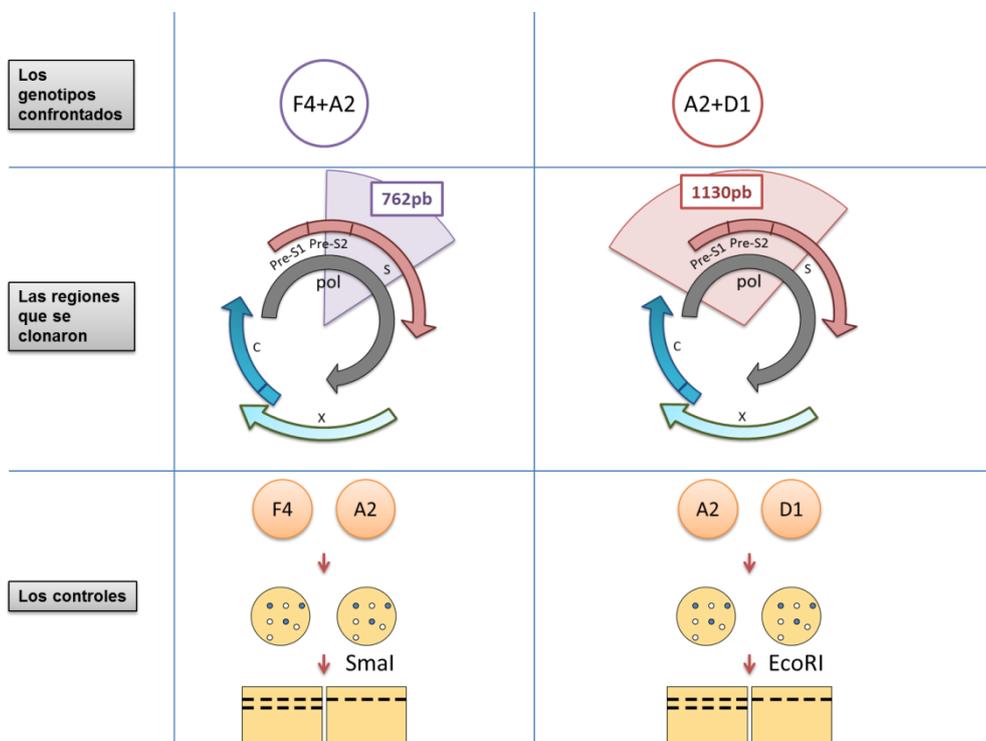


FIGURA 19: ESQUEMA DEL EXPERIMENTO DE *FITNESS* REPLICATIVO ENTRE GENOTIPOS (A2VSF4 Y A2VSD1).

En la figura se muestran las variantes virales confrontadas, las regiones del genoma que se utilizaron para la clonación y los patrones de RFLP esperados (Los controles)

5.1. ANÁLISIS DE LA DIFERENCIA DE *FITNESS* ENTRE LOS *sgtF1B* Y *sgtF4*

Fitness replicativo en múltiples ciclos

Considerando que durante la transfección las nuevas partículas virales no pueden infectar las células no infectadas, se propuso hacer una simulación del segundo, tercer y cuarto ciclo para poder observar la dinámica de la progenie.

Se realizó la transfección en células Huh7 utilizando las mezclas de clones previamente obtenidas. Cada experimento se hizo por sextuplicado cotransfectando F1b y F4 en diferentes relaciones.

Después de hacer el experimento inicial (primer ciclo) en relación 50%-50%, se obtuvieron las frecuencias de las dos variantes en la progenie y esta nueva relación se utilizó para el siguiente experimento (segundo ciclo). La nueva relación, que proviene de la progenie del segundo ciclo, se usó como inicial para el tercer ciclo, etc (Figura 20).

La transfección se realizó en la misma manera en que ha sido descrito previamente. Las diferencias en las frecuencias se evaluaron usando test de Fisher.

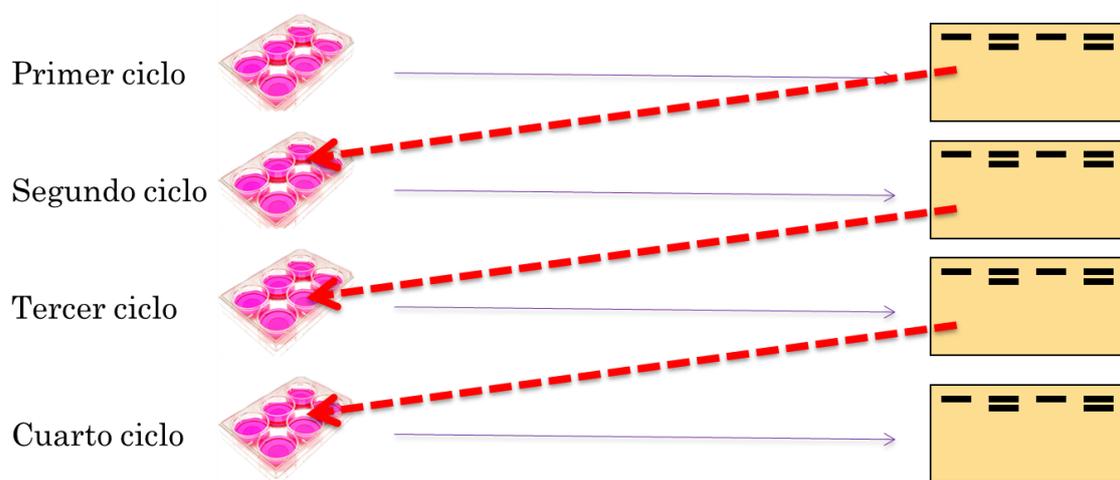


FIGURA 20: ESQUEMA DEL EXPERIMENTO DE *FITNESS* EN MÚLTIPLES CICLOS

6. ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS ASOCIADOS A LA DIFERENCIA DE *FITNESS* REPLICATIVO

En base a los resultados obtenidos en los puntos 4 y 5, se eligieron aquellos pares de variantes (sgtD1cs vs sgtD1del y sgtD1mut vs sgtD1del) o de subgenotipos (F1b vs F4) en los cuales se observó una diferencia significativa en la progenie, a fin de analizar los mecanismos asociados a la diferencia observada.

Para ello, se analizaron los niveles de ADN viral en el sobrenadante de cultivo, la producción de los intermediarios replicativos intracelulares y el nivel de expresión de los antígenos HBsAg y HBeAg.

Se realizó la transfección en células Huh7 utilizando las mezclas de clones obtenidas previamente. Los experimentos se hicieron transfectando las dos variantes confrontadas por separado y en conjunto, siguiendo los protocolos descriptos previamente.

El medio de infección fue remplazado cada 24h, y finalmente se recogieron el sobrenadante del cultivo celular y las células a las 96 horas pos transfección. Se realizaron tres experimentos independientes para cada par de variantes analizadas (Figura 21).

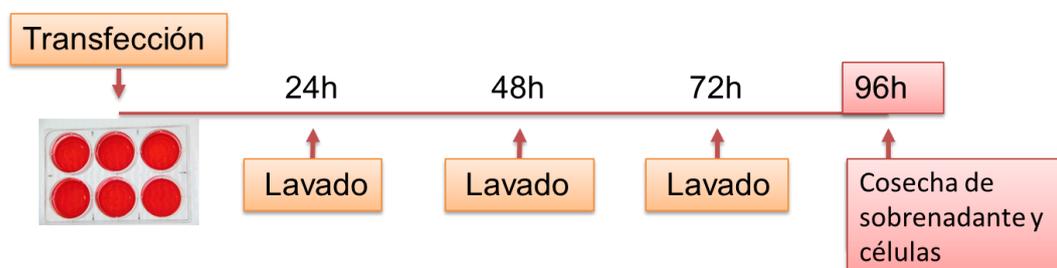


FIGURA 21: ESQUEMA DE LA TRANSFECCIÓN

Ensayo de luciferasa

Los pocillos transfectados con genomas de HBV también se co-transfectaron con 0,05µg del vector plu l413 [luc2 / SV40] (Promega) de luciferasa, como control de la eficiencia de la transfección. Para evaluar la emisión de luz producida por la actividad de luciferasa, se mezclaron 20 µl de lisado celular con el reactivo comercial Luciferase Assay System, siguiendo las instrucciones del fabricante, y se detectaron unidades relativas de luz (RLU). Todos los resultados se expresaron por unidad de luz relativa.

Materiales y métodos

Cosecha

Se recogieron los sobrenadantes 96 hs después de la transfección para el análisis por qPCR y para la determinación de los niveles de HBsAg y HBeAg. Por otro lado, las células se cosecharon para el análisis por Southern blot y para el ensayo de luciferasa.

Las células transfectadas se trataron con solución de lisis (Tris / HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, NP40 al 0,5%) y se centrifugaron 10 min a 4000 rcf. Se utilizaron 20 µl del sobrenadante de lisado celular para el ensayo de luciferasa. A partir del volumen remanente se realizó la extracción de ácidos nucleicos, mediante digestión con proteinasa K y purificación con fenol-cloroformo (Figura 22).

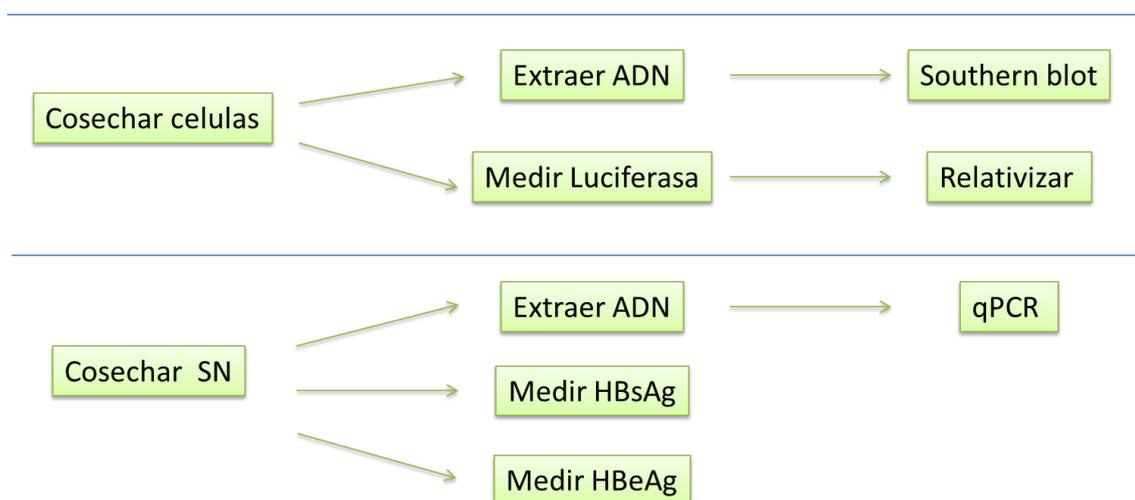


FIGURA 22: ESQUEMA DE LA COSECHA Y ANÁLISIS

Análisis de ADN intracelular por Southern blot

En los experimentos de *fitness* en los cuales se observaron diferencias entre las variantes, se evaluó el ADN proveniente de las partículas virales del sobrenadante del cultivo (el último paso del ciclo viral, la liberación de la progenie). Además, considerando la posibilidad de que la diferencia observada podría deberse a diferencias en los niveles de ADN intracelular (antes de la liberación de la partícula viral), se realizó un experimento de evaluación de ADN intracelular.

Se realizó una transfección de células Huh7 utilizando las mezclas de clones obtenidas previamente.

Materiales y métodos

A las 96hs postransfección se cosecharon las células usando la solución de lisis. Esta produce una lisis suave que no rompe los núcleos celulares, por lo cual el cccADN no va a estar visible entre los intermediarios replicativos.

La extracción de ADN viral se hizo mediante el método fenol-cloroformo y ADN obtenido se corrió en un gel de agarosa 1X y se reveló con *Southern blot*. Los resultados se expresaron en µg por unidad de luz de luciferasa.

En cada experimento se analizó también el control negativo – mock (ADN no replicativo) como control de posible input remanente (ver sección 8. Controles).

Cuantificación del ADN del HBV en el sobrenadante

Se extrajo ADN viral de 200µl de sobrenadante usando método fenol-cloroformo en la manera previamente descrita.

La cuantificación se realizó utilizando la técnica de PCR en tiempo real con el reactivo comercial LightCycler® DNA Master SYBR Green (Roche), amplificando un fragmento de 200 pb. Los cebadores usados para esta amplificación fueron: sentido ATGGAGACCACCGTGAACGC y antisentido AGGCACAGCTTGGTGGCTTG.

Los resultados se expresaron en copias genómicas/ml por unidad de luz de luciferasa.

Determinación de HBsAg en el sobrenadante de cultivo

Para comparar los niveles de expresión entre las variantes virales se cuantificó HBsAg a las 96 h post-transfección utilizando el inmunoensayo de quimioluminiscencia ARCHITECT HBsAg (Abbott), según indicaciones del fabricante. Los resultados se expresaron en UI/ml por unidad de luz de luciferasa.

Determinación de HBeAg en el sobrenadante de cultivo

Para comparar los niveles de expresión entre las variantes virales se cuantificó HBeAg a las 96 h post-transfección utilizando el inmunoensayo de quimioluminiscencia ARCHITECT HBeAg (Abbott), según indicaciones del fabricante. Los resultados se expresaron en S/CO por unidad de luz de luciferasa.

Materiales y métodos

7. TEST ESTADÍSTICO

Las diferencias entre las variantes virales confrontadas en los experimentos de *fitness* se calcularon como diferencias de las sumas de repeticiones usando test exacto de Fisher. Cuando se trata de las variables discretas obtenidas por conteo se suele usar la suma para disminuir la probabilidad de error debido al tamaño de muestra. La dispersión entre las repeticiones se calculó usando Chi-cuadrado para corroborar que no existe diferencia significativa entre las repeticiones. Por otro lado, la variabilidad de datos se representó mediante el promedio y el desvío estándar. El valor p menor o igual a 0,05 se consideró como valor estadísticamente significativo.

Las diferencias entre las variantes virales en los experimentos de evaluación de ADN intracelular y extracelular y de evaluación de proteínas virales fueron calculadas usando el test de Student. El valor p menor a 0,05 se consideró como estadísticamente significativo.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

8. CONTROLES

8.1 CONTROLES DE LOS EXPERIMENTOS DE *FITNESS*

Por experimento cada experimento realizado, se transfectó un pocillo con mock (cepa de HBV con la delección de 370 nucleótidos en la región de Core) como control de input remanente y se realizó una PCR con los cebadores s: ATGGAGACCACCGTGAACGC y as: AGGCACAGCTTGGTGGCTTG para confirmar que el input no fue detectable en las condiciones usadas (Apéndice 2d).

8.2 CONTROLES DE *SOUTHERN BLOT*

a) Un pocillo por experimento fue transfectado con mock (genoma entero lineal de HBV derivado del plasmido pCH-9/3091 POL negativo, amablemente cedido por Dr. Michael Nassal) como control de input remanente. Este pocillo se procesó de la misma manera que los correspondientes a los experimentos de confrontación de variantes

Materiales y métodos

b) Los tamaños de las bandas en los geles se verificaron por comparación con un marcador de peso molecular.

c) En todos los experimentos se utilizó una curva de calibración para verificar que las muestras que se están evaluando se encuentran dentro de los límites de la curva, y no en los niveles de saturación (Apéndice 2g).

d) Se hizo un experimento para verificar que la sonda no se une inespecíficamente al ADN proveniente de la célula (Apéndice 2i).

8.3 CONTROLES DE LA PCR EN TIEMPO REAL

a) Un pocillo por experimento fue transfectado con mock (genoma entero lineal de HBV derivado del plasmido pCH-9/3091 POL negativo como control de input remanente y se cuantificó. De cada resultado se restó el valor obtenido.

b) Cada experimento se corrió con la curva de calibración para verificar que las muestras que se están evaluando se encuentran dentro de los límites de la curva y no en los niveles de saturación (Apéndice 2h).

Resultados

Resultados

1. METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE *FITNESS* REPLICATIVO

En este trabajo, se desarrolló un método para la evaluación del *fitness* replicativo entre variantes virales del HBV. A partir de un proceso de cotransfección, el ADN genómico extraído del sobrenadante de cultivo celular (ADN progenie) fue amplificado por PCR, sujeto a clonado molecular y caracterización por RFLP. La frecuencia relativa de cada variante en la progenie determina el *fitness* replicativo para ese par de variantes.

Este método fue aplicado a la determinación del *fitness* replicativo en dos escenarios evolutivos: intrahospedador (proceso de seroconversión) e interhospedador (ocupación de nicho ecológico). El primero de ellos fue evaluado mediante el estudio de cepas de sgtD1 provenientes de un paciente con infección crónica y el segundo, mediante el análisis de los (sub)genotipos más prevalentes en la Ciudad de Buenos Aires.

2. DETERMINACIÓN DEL *FITNESS* REPLICATIVO DEL sgtD1 CEPA SALVAJE Y LAS CEPAS MUTADAS: PROCESO DE SEROCONVERSIÓN

El *fitness* replicativo de sgtD1cs, sgtD1del y sgtD1mut fue evaluado mediante el método de cotransfección desarrollado en este trabajo de Tesis. Se cotransfectaron células Huh7 con dos variantes virales: sgtD1cs vs sgtD1mut, sgtD1cs vs sgtD1del, sgtD1mut vs sgtD1del; y luego se determinó la frecuencia de las variantes virales en la progenie. Este experimento se realizó por sextuplicado para cada par de variantes analizado. En los tres casos, la dispersión entre las repeticiones no fue significativa (Figura 24a y 24b), lo que permitió expresar el resultado como la sumatoria de los seis experimentos (Figura 24c y apéndice 1a).

En el caso del experimento sgtD1cs vs sgtD1mut, en la progenie se observó una proporción de cada variante similar a la proporción inicial ($p=0,8$). En los otros dos experimentos (sgtD1del vs sgtD1cs o sgtD1del vs sgtD1mut) la progenie estuvo compuesta mayormente por sgtD1cs ($p<0.0001$) o sgtD1mut ($p= 0.0001$) (Figura 24c y apéndice 1a).

Resultados

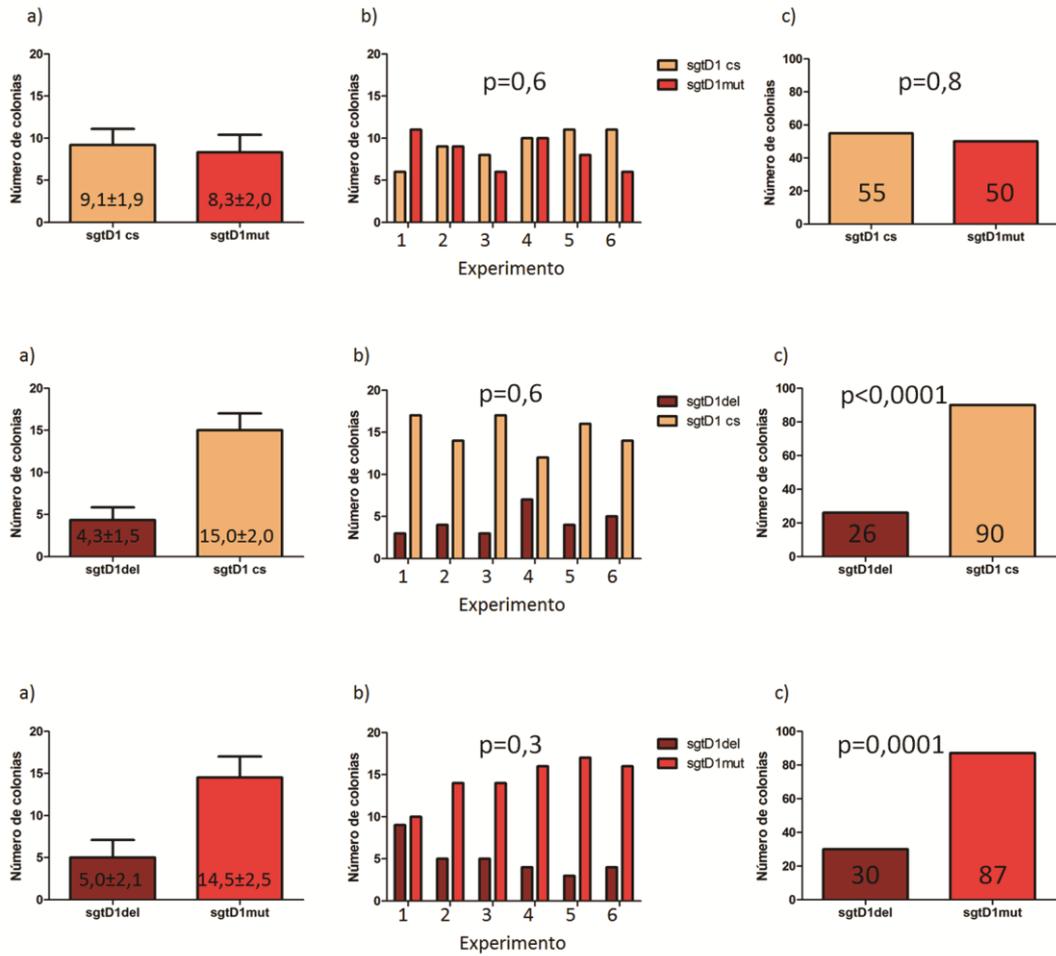


FIGURA 23: EVALUACIÓN DEL *FITNESS* DE *sgtD1* CEPA SALVAJE Y DE LAS CEPAS MUTADAS

a) Los valores representan el promedio de los sextuplicados, las barras de error representan los desvíos estándar. b) Las barras representan las seis repeticiones del experimento, los valores p muestran la significancia de la dispersión entre las repeticiones calculada mediante chi-cuadrado. c) Los resultados de los experimentos están calculados como suma de las repeticiones; el valor p muestra la significancia de las diferencias observadas y fue calculado mediante test de Fisher.

Resultados

3. DETERMINACIÓN DEL *FITNESS* REPLICATIVO ENTRE LAS POBLACIONES SALVAJES DE LOS SUBGENOTIPOS

Se diseñó una serie de experimentos para evaluar la diferencia del *fitness* replicativo entre los subgenotipos. Para ese fin se cotransfectaron todas las posibles combinaciones de los subgenotipos (F1b vs F4, F1b vs A2, F1b vs D1, F4 vs A2, F4 vs D1 y A2 vs D1). En ninguno de los experimentos la dispersión entre las repeticiones fue significativa (Figura 25a y 25b).

En todos los casos excepto en la cotransfección con F1b vs F4, la progenie mantuvo aproximadamente la misma proporción de las variantes que la inicial (Figura 25c y apéndice 1a).

Considerando que el experimento F1b con F4 mostró una tendencia hacia el punto de corte estadístico, se realizaron seis experimentos adicionales para elevar el número de clones analizados y con eso mejorar la potencia estadística de análisis. En la progenie resultante se halló una mayor proporción de clones F1b que de F4, con el p-valor en el punto de corte estadístico ($p=0,05$) (Figura 25c y apéndice 1a).

2.1. *Fitness* replicativo en múltiples ciclos

Debido a que durante la transfección las nuevas partículas virales no pueden infectar nuevas células, se realizó una simulación del segundo, tercer y cuarto ciclo de infección con el fin de poder observar la dinámica de la progenie.

En ninguno de los experimentos la dispersión entre las repeticiones fue significativa (Figura 26a y 26b).

Después del experimento inicial (primer ciclo) se utilizó la proporción de F1b y F4 hallada en la progenie (60%-40%) como la frecuencia inicial para la siguiente cotransfección (segundo ciclo); la frecuencia resultante de esta cotransfección (73%-27%) como inicial de la siguiente (tercer ciclo) y la frecuencia resultante de esta cotransfección (81%-19%) como inicial para la última cotransfección (cuarto ciclo). Finalmente, la progenie de este último ciclo presentó una proporción de 93%-7% (Figura 26 y apéndice 1a).

Los cuatro resultados tenían un valor p estadísticamente significativo (Figura 26c).

Estos resultados confirman la ventaja comparativa del sgtF1b respecto del sgtF4 en un ensayo competitivo de producción viral (Figura 27).

Resultados

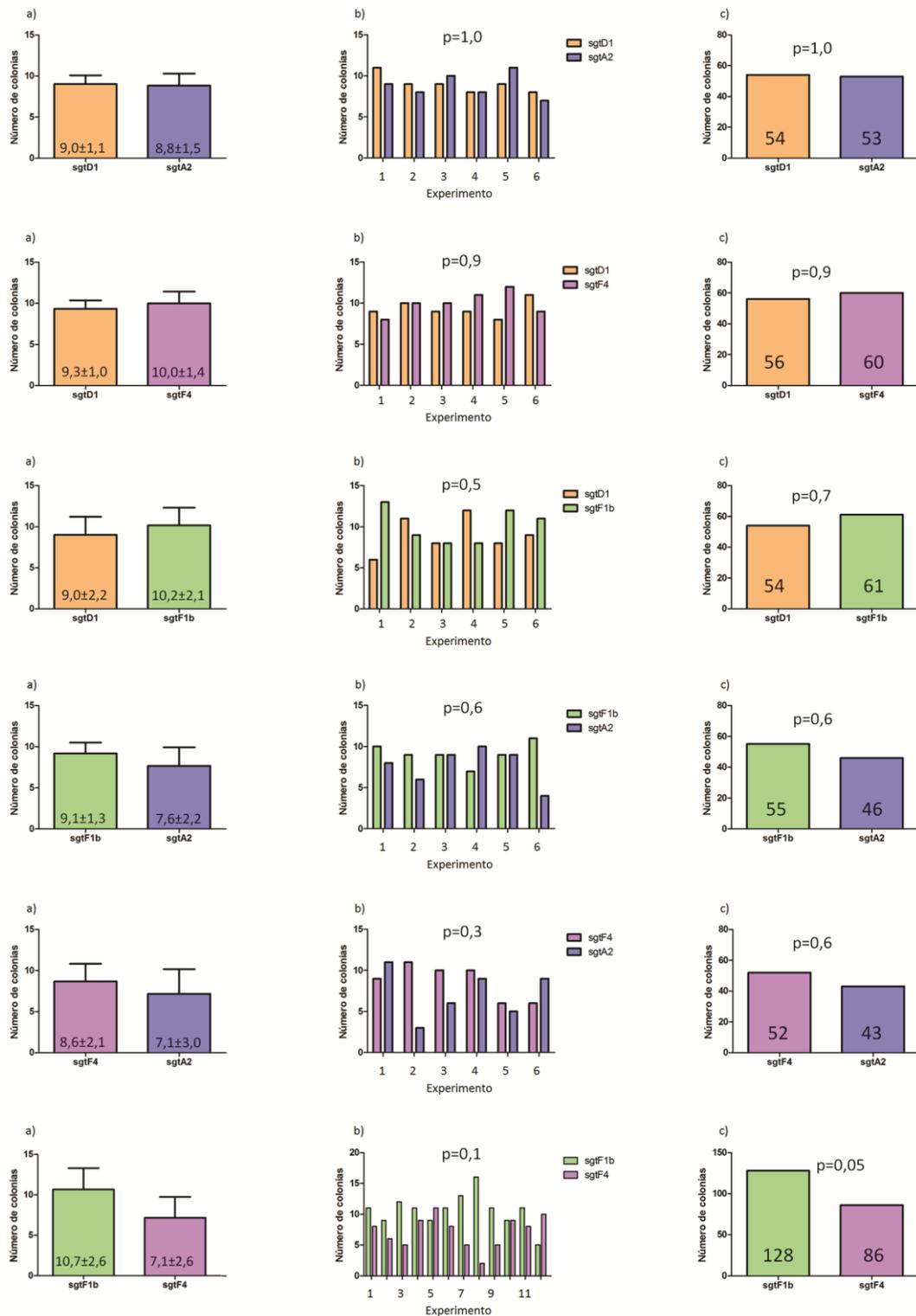


FIGURA 24: EVALUACIÓN DEL *FITNESS* REPLICATIVO ENTRE LOS GENOTIPOS. a) Los valores representan promedio de los sextuplicados (12 para F1b-F4), las barras de error representan los desvíos estándar. b) Las barras representan las seis repeticiones (12 para F1b-F4) del experimento, los valores p muestran la significancia de la dispersión entre las repeticiones calculada mediante chi-cuadrado. c) Los resultados de los experimentos

Resultados

están calculados como la suma de las repeticiones; el valor p indica la significancia de las diferencias observadas y fue calculado mediante test de Fisher.

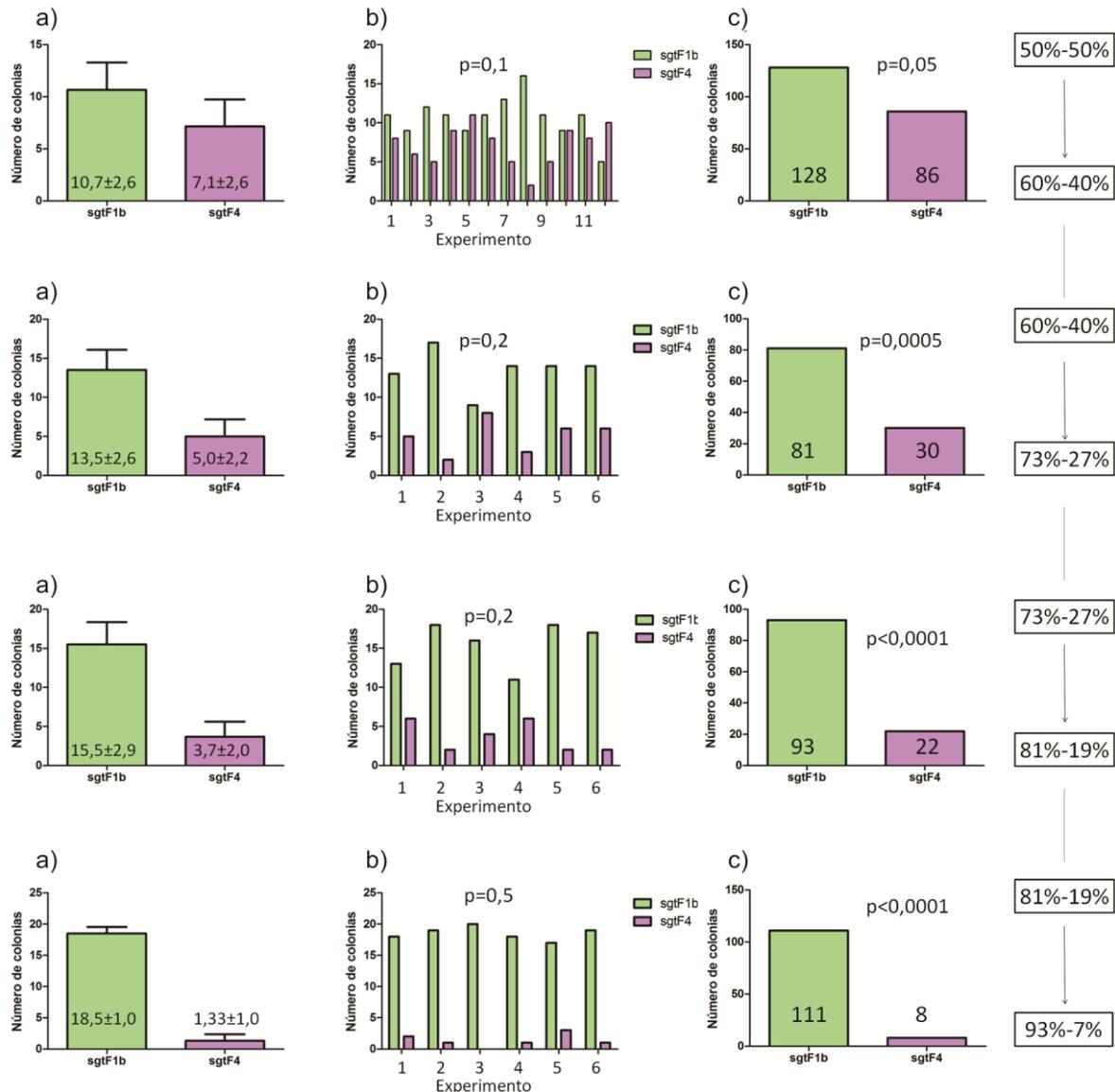


FIGURA 25: *FITNESS* REPLICATIVO EN MÚLTIPLES CICLOS

a) Los valores representan el promedio de los sextuplicados (12 en primer experimento), las barras de error representan los desvíos estándar. b) Las barras representan las seis repeticiones (12 en primer experimento) del experimento, los valores p muestran la significancia de la dispersión entre las repeticiones calculada mediante la prueba de chi-cuadrado. c) Los resultados de los experimentos están calculados como la suma de las repeticiones; el valor p muestra la significancia de las diferencias observadas y fue calculado mediante test de Fisher.

Resultados

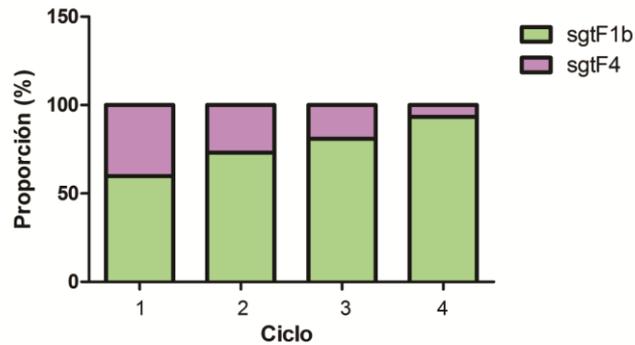


FIGURA 26: RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA COMPETICIÓN ENTRE SGT F1B Y SGT F4

4. ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS ASOCIADOS A LA DIFERENCIA DE *FITNESS* REPLICATIVO

EXPERIMENTO DE SEROCONVERSIÓN

Los genomas completos de sgtD1cs, sgtD1mut y sgtD1del se transfectaron y cotransfectaron de a pares en células Huh7 con el fin de evaluar: la síntesis de los intermediarios replicativos, los niveles de ADN extracelular y la expresión de los antígenos HBsAg y HBeAg.

En el análisis de *Southern blot* en ninguno de los experimentos se visualizó el control negativo del experimento, lo que comprueba que no hubo interferencias del *input* (ADN utilizado para transfectar) con el resultado final del *Southern blot*.

La solución de lisis usada para este experimento no genera lisis nuclear, por lo cual no se observó cccADN. La exposición de la placa radiográfica a luminiscencia fue muy corta con el fin de disminuir el ruido del fondo y obtener sólo una banda fuerte cuantificable por este método. La banda observada presentó el tamaño esperado para el genoma lineal de doble cadena del HBV.

El análisis de los intermediarios replicativos no mostró diferencias significativas entre sgtD1cs y sgtD1mut, mientras que sgtD1del mostró un nivel de ADN significativamente menor en comparación con sgtD1cs y sgtD1mut.

Resultados

Sorprendentemente, en el ensayo de cotransfección, no se observó diferencia significativa entre la mezcla sgtD1cs+sgtD1del y sgtD1cs, mientras que si se observaron diferencias significativas al comparar la mezcla sgtD1mut+sgtD1del con sgtD1mut (Figuras 28a y 28b y apéndice 1b). Es decir, las mezclas no mostraron los valores promedio de las dos variantes transfectadas por separado.

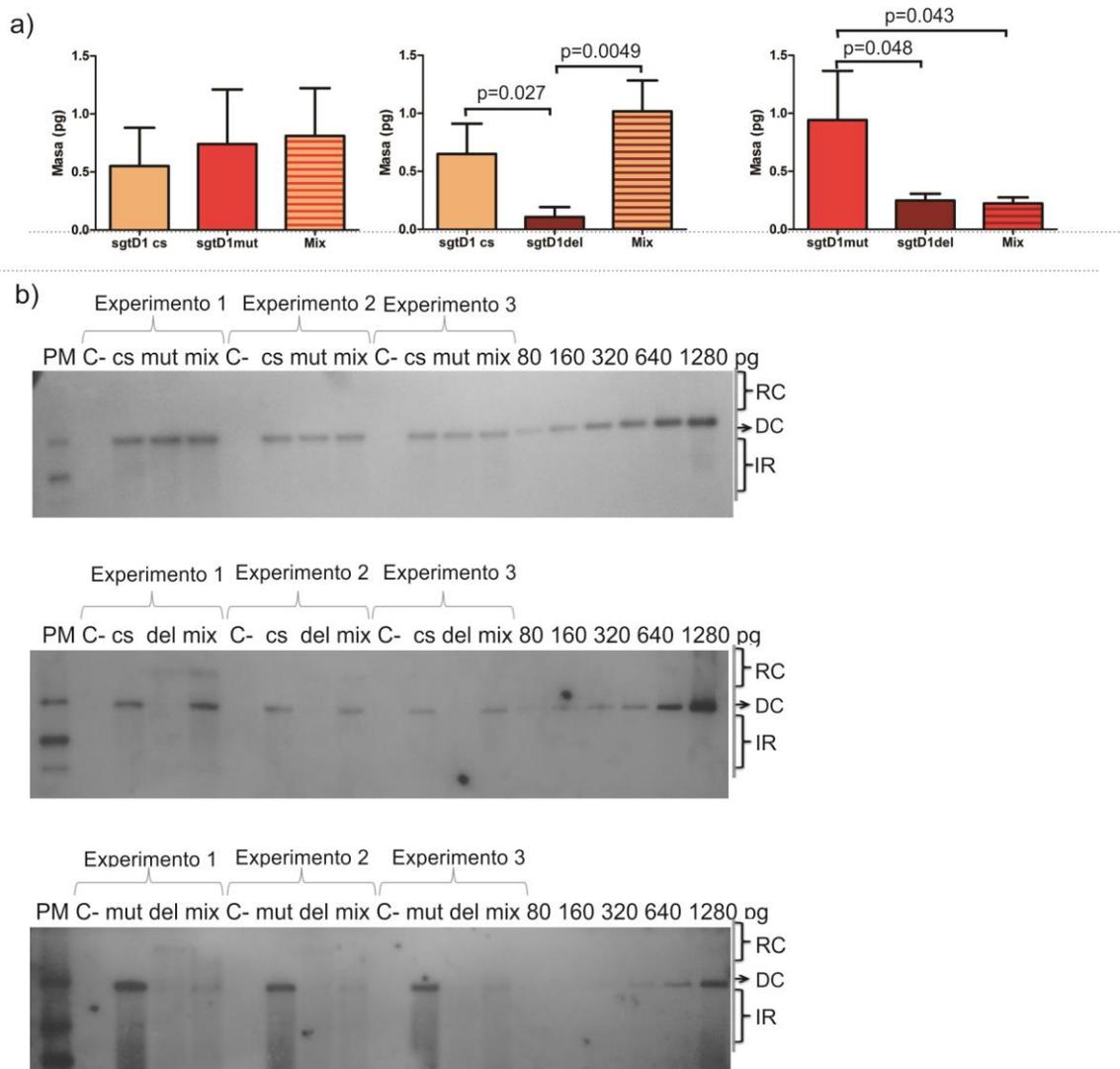


FIGURA 27: *SOUTHERN BLOT* DE sgtD1 CEPA SALVAJE Y DE LAS CEPAS MUTADAS

a) Solo la banda DC fue cuantificada y los resultados fueron expresados en pg (por unidad de luz de luciferasa - RLU). Se realizaron tres experimentos independientes y sólo se muestran los valores $p < 0.05$ b) *Southern blot* de ADN intracelular de HBV.

RC: ADN relajado circular del HBV; DC: ADN lineal de doble cadena de HBV, IR: Intermediarios replicativos del HBV.

Resultados

Los resultados de los análisis del ADN extracelular no mostraron diferencias significativas entre las variantes virales en los experimentos sgtD1cs+sgtD1mut y sgtD1cs+sgtD1del.

En el experimento sgtD1mut+sgtD1del se observó que la variante sgtD1mut tenía significativamente mayor nivel de ADN en comparación con la sgtD1del y con la mezcla de ambas (Figura 29 y apéndice 1b).

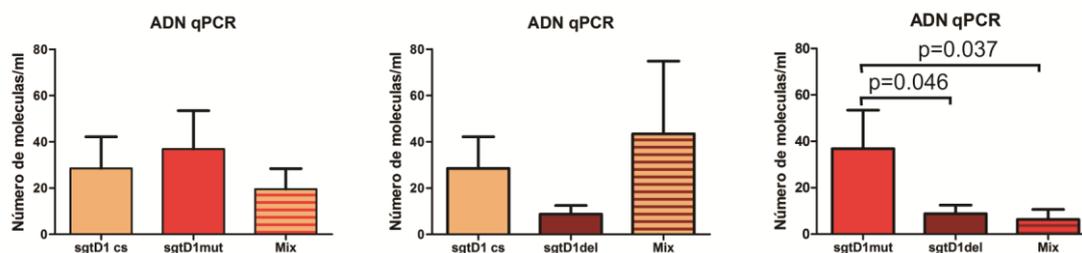


FIGURA 28: RESULTADO DE PCR EN TIEMPO REAL DE sgtD1 CEPA SALVAJE Y DE LAS CEPAS MUTADAS

Control del input fue cuantificado y fue restado de cada uno de los valores obtenidos para las variantes virales. Los resultados están expresados relativos a la luciferasa (por unidad de luz de luciferasa - RLU). Se hicieron tres experimentos independientes y se mostraron solo los valores $p < 0.05$.

SgtD1mut y sgtD1del no expresaron HBeAg y no se observaron diferencias significativas entre sgtD1cs y las mezclas (cotransfecciones) (Figura 30^a y apéndice 1b).

La expresión del HBsAg fue significativamente mayor en sgtD1cs comparada con la hallada en sgtD1mut y sgtD1del, mientras que las últimas dos no presentaron diferencias significativas entre sí. Comparando sgtD1del con la mezcla sgtD1cs+sgtD1del se observó una expresión significativamente menor de HBsAg en sgtD1del. No se observaron diferencias significativas entre otras variantes y mezclas (Figura 30b y apéndice 1b).

Resultados

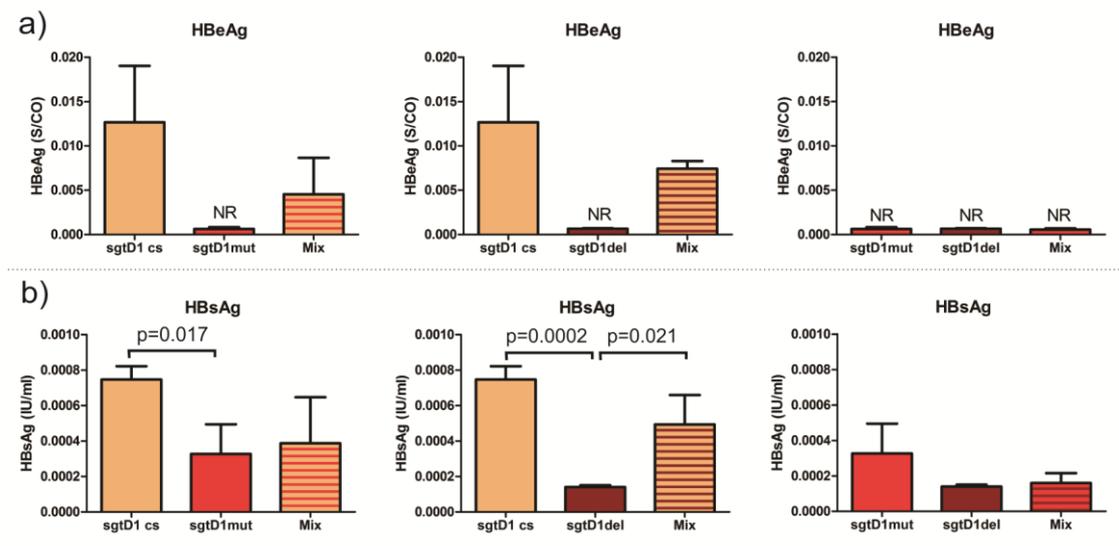


FIGURA 29: EXPRESIÓN DE HBeAg Y HBsAg DE sgtD1 CEPA SALVAJE Y DE LAS CEPAS MUTADAS

- a) Los resultados de la evaluación de los niveles de HBeAg se expresan en S/CO relativo a la unidad de luz de luciferasa - RLU. Se realizaron tres experimentos independientes y se muestran sólo los valores $p < 0.05$.
- b) Los resultados de la evaluación de los niveles de HBsAg se expresan en IU/ml relativo a la unidad de luz de luciferasa - RLU. Se realizaron tres experimentos independientes y se muestran sólo los valores $p < 0.05$.

EXPERIMENTO DE OCUPACIÓN DEL NICHÓ ECOLÓGICO

Se transfectaron por separado y se cotransfectaron los genomas completos de sgtF1b y sgtF4 en células Huh7 con el fin de evaluar: la síntesis de los intermediarios replicativos, los niveles de ADN extracelular y la expresión de los antígenos HBsAg y HBeAg.

La síntesis de los intermediarios replicativos de los sgtF1b y sgtF4 fue evaluada mediante *Southern blot*. En ninguno de los experimentos se visualizó el control negativo correspondiente, lo que comprueba que no hubo interferencias del ADN utilizado para transfectar con el resultado final del *Southern blot* (Figura 31 y apéndice 1b).

Resultados

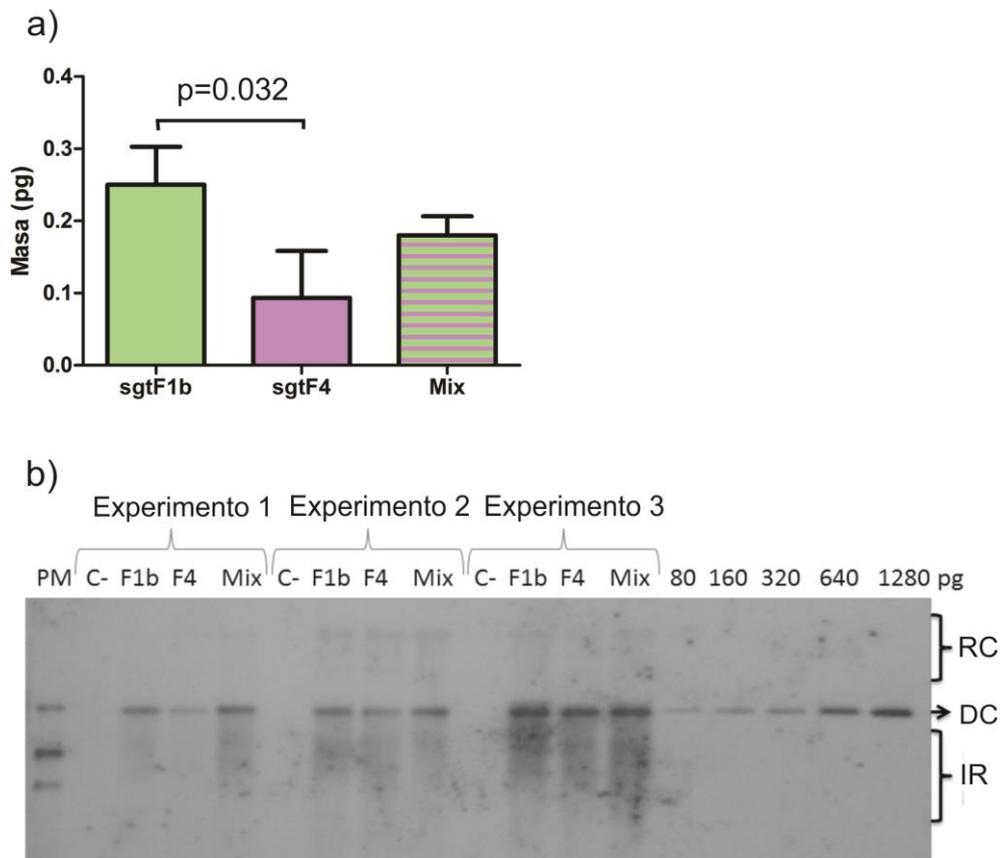


FIGURA 30: *SOUTHERN BLOT* DE LOS sgtF1B Y sgtF4.

a) Sólo la banda DC fue cuantificada y los resultados fueron expresados en pg (por unidad de luz de luciferasa - RLU). Se realizaron tres experimentos independientes y se muestran sólo los valores $p < 0.05$ b) *Southern blot* de ADN intracelular de HBV.

RC: ADN relajado circular del HBV; DS: ADN lineal de doble cadena de HBV, IR: Intermediarios replicativos del HBV.

La solución de lisis usada para este experimento no genera lisis nuclear, por lo cual no se observa cccADN. La exposición de la placa radiográfica a luminiscencia fue muy corta con el fin de disminuir el ruido del fondo y obtener sólo una banda fuerte cuantificable por este método. La banda observada presentó el tamaño esperado para el genoma lineal de doble cadena del HBV.

Los resultados mostraron que el sgtF1b presenta mayor cantidad de ADN doble cadena intracelular comparado con sgtF4, mientras que no se observaron diferencias significativas entre la mezcla y sgtF1b o sgtF4.

Resultados

Los resultados del análisis del ADN extracelular mostraron que el sgtF1b como también la mezcla tenían niveles de ADN significativamente más altos que sgtF4, mientras que, no se observaron diferencias significativas entre la mezcla y sgtF1b (Figura 32 y apéndice 1b).

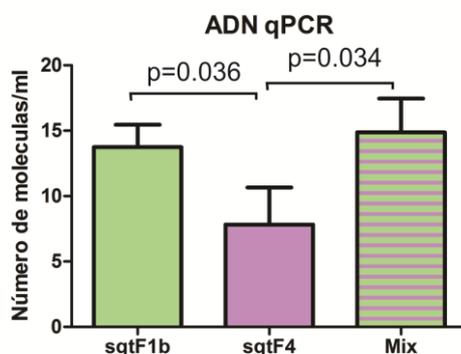


FIGURA 31: PCR EN TIEMPO REAL DE sgtF1B Y sgtF4.

El control del input fue cuantificado y restado de cada uno de los valores obtenidos para las variantes virales. Los resultados se expresan relativos a la luciferasa (por unidad de luz de luciferasa - RLU). Se realizaron tres experimentos independientes y se muestran sólo los valores $p < 0.05$.

No se observaron diferencias significativas en la expresión del HBsAg entre las variantes, mientras que, los resultados de la expresión de HBeAg mostraron que el sgtF4 expresa mayor nivel de HBeAg comparando con el sgtF1b y con la mezcla. Por otro lado, la diferencia en la expresión de HBeAg entre sgtF1b y la mezcla no fue significativa (Figuras 33a y 33b y apéndice 1b).

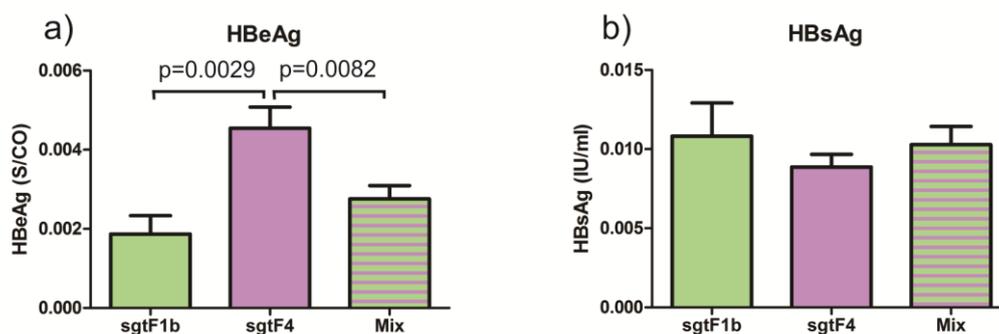


FIGURA 32: EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS HBEAG Y HBSAG DE sgtF1B Y sgtF4.

a) Los resultados de la evaluación de los niveles de HBeAg se expresan en S/CO relativo a la unidad de luz de luciferasa - RLU. Se realizaron tres experimentos independientes y sólo se muestran los valores $p < 0.05$.

b) Los resultados de la evaluación de los niveles de HBsAg se expresan en IU/ml relativo a la unidad de luz de luciferasa - RLU. Se realizaron tres experimentos independientes y sólo se muestran los valores $p < 0.05$.

Discusión

Discusión

El HBV es un virus hepatotrópico que produce infecciones agudas y crónicas. El 90-95 % de los adultos inmunocompetentes resuelven la infección en la etapa aguda, mientras que sólo un 5%-10% de las infecciones progresan hacia una infección crónica. Por el contrario, las infecciones en niños menores de un año y en adultos inmunocomprometidos suelen evolucionar hacia una infección crónica ((WHO) 2017).

Los antivirales comercialmente disponibles para los individuos infectados en forma crónica se administran con el objetivo de suprimir la replicación viral y prevenir la progresión de la enfermedad hepática, sin embargo, no alcanzan a eliminar la infección. Desde 1982 existe una vacuna segura y eficaz para la prevención de la hepatitis B. Sin embargo, la infección por este virus sigue siendo un importante problema de salud global con aproximadamente 257 millones de individuos infectados crónicamente ((WHO) 2017).

Durante el curso de la infección crónica, el HBV evoluciona desde una etapa de alta replicación y presencia de HBeAg hacia una etapa de baja replicación viral y presencia de anticuerpos anti-HBeAg. Este proceso, denominado seroconversión, se caracteriza por la fijación de las mutaciones en diferentes partes del genoma viral, sobre todo, en las regiones del BCP y del pC. La seroconversión es un evento clave en la historia natural de la infección crónica ya que se asocia con menor replicación viral que lleva tanto a la disminución del daño hepático como a una menor probabilidad de transmisión (Gao et al. 2015).

El genoma del HBV posee una alta diversidad debido, en parte, a que la polimerasa viral carece de la actividad *proofreading* (corrección de errores). El HBV ha sido clasificado en 10 genotipos que muestran distinta distribución geográfica y presentan diferencias en relación al curso de la infección y a la progresión de la enfermedad (Lin y Kao 2017). Por ejemplo, en un estudio realizado en personas nativas de Alaska con infección crónica por HBV caracterizada por 5 genotipos circulantes (A, B, C, D y F), los genotipos F y C se asociaron significativamente con el desarrollo de HCC (Livingston et al. 2007; Ching et al. 2016).

Discusión

A su vez, dentro de la población viral se pueden encontrar diferentes variantes que resultan tanto de eventos de deriva génica (azar) como de distintos eventos selectivos, como el uso de antivirales, el proceso de seroconversión o el uso de las vacunas. La comprensión de las bases moleculares de la emergencia y fijación de esas variantes es de gran importancia para entender su rol en la infección crónica (Gao et al. 2015).

El papel de las mutantes o de los genotipos en la historia natural y en la patogenia de la infección por HBV se encuentra actualmente bajo un estudio exhaustivo (Fung y Lok 2004; Lin y Kao 2017). Sin embargo, los estudios sobre el genotipo F son escasos y en particular, carecen de un abordaje molecular.

El objetivo de este trabajo de Tesis fue estudiar las bases moleculares de la evolución de distintos genotipos de HBV y diferentes mutantes que emergen en la infección crónica. Para poder alcanzar ese objetivo, en primera instancia, se desarrolló una metodología que permite evaluar el *fitness* replicativo de las variantes virales del HBV.

DETERMINACIÓN DEL *FITNESS* REPLICATIVO

El HBV tiene una alta tasa de mutación y, en consecuencia, el virus existe como una mezcla de variantes genéticamente diferentes, pero estrechamente relacionadas, cuyas frecuencias relativas dependen de la capacidad de cada variante de replicarse en un entorno particular. La ocupación de un nicho ecológico por las variantes que albergan mutaciones determinadas o por genotipos específicos es un proceso dinámico que depende de la capacidad de cada población viral de imponerse sobre las demás en cada entorno determinado (Gao et al. 2015; Andino y Domingo 2015).

El *fitness* viral es una medida relativa de la adaptación de la variante viral a un entorno específico y es de importancia para comprender su emergencia o eliminación en un microambiente particular (Andino y Domingo 2015; Domingo et al. 2000; Domingo y Gomez 2007).

Para el HBV, a diferencia de lo que ocurre para muchos otros virus, no se posee un sistema de cultivo celular que permita una infección eficiente *in vitro*, lo cual constituye una fuerte

Discusión

limitación para el estudio del *fitness*. Actualmente, el sistema de transfección se utiliza para la evaluación de diferentes variantes del HBV. En el presente trabajo de Tesis se desarrolló un método de cotransfección con el objetivo de determinar el *fitness* viral a nivel celular (*fitness* replicativo). Este sistema consiste en la cotransfección con genomas enteros de dos variantes virales, seguida por la comparación de sus frecuencias relativas en la progenie viral mediante clonado y PCR-RFLP.

Mediante esta metodología es posible determinar la proporción de las variantes virales presentes en la progenie resultante de una competición *in vitro*. Existen numerosos contextos clínicos y epidemiológicos donde la evaluación del *fitness* sería útil para comprender el proceso de selección. En este trabajo de Tesis se presenta un ensayo de *fitness* replicativo del HBV y se utilizan para su evaluación dos escenarios evolutivos: a) el proceso de seroconversión y b) la ocupación del nicho ecológico.

A) PROCESO DE SEROCONVERSIÓN

Durante el proceso de seroconversión se fijan mutaciones en las regiones del pC y del BCP. En un trabajo previo se estudió la evolución del HBV en un paciente con infección crónica y se encontraron, a lo largo del tiempo estudiado, dos poblaciones mutantes además de la población salvaje (sgtD1cs). Las poblaciones mutantes correspondían a las regiones BCP (variante delecionada - sgtD1del) y pC (mutante - sgtD1mut). Curiosamente la variante delecionada predominó durante todo el período estudiado (Sede et al. 2014).

La sgtD1mut presenta la mutación G1896A en la región pC que convierte al codón que codifica el triptófano (TGG) en un codón de stop de traducción (TAG) y detiene la producción de HBeAg. Esta mutación ocurre frecuentemente en el genotipo D y, según estudios previos y los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, presenta el mismo nivel de replicación que la cepa salvaje (Geng et al. 2016; Milich y Liang 2003; Jammeh et al. 2008). Cabe destacar que esto se encuentra en concordancia con la proporción relativa de las cepas salvaje y mutada hallada en el paciente bajo estudio.

Por otra parte, la sgtD1del presenta una deleción de 8 nucleótidos (1763-1770) que afecta la región del Enhancer II, del BCP y del gen X y se la ha asociado con bajos niveles de proteínas virales (Moriyama 1997). Nuestros resultados mostraron que la sgtD1del

Discusión

presentó menor nivel de replicación en comparación con ambos sgtD1cs y sgtD1mut, lo que concuerda con un estudio previo (Fischer et al. 2006) aunque difiere de lo descrito por Moriyama et al. quien encontró niveles de replicación similares entre las variantes (Moriyama 1997).

Por lo tanto, la menor capacidad replicativa de la sgtD1del no explica, por si misma, el hecho de su mayor predominio durante todo el proceso de infección crónica estudiado. Sin embargo, esto concuerda con lo descrito en un estudio realizado en donantes de sangre en Yemen donde se encontró que dos pacientes HBeAg negativos presentaron variantes con la delección 1763-1770 sola y en combinación con la delección 1746-1757, las que resultaron predominantes a pesar de la baja carga viral (<400 copias/ml) (Sallam y Tong 2002).

Esta diferencia entre los resultados observados *in vitro* e *in vivo* podría explicarse debido a que el nivel de replicación no es el único factor que determina la selección de una variante viral específica *in vivo*. Otros factores, como la interacción con el sistema inmunológico del individuo, podrían cumplir un rol determinante.

En este sentido, Kim et al. describieron una variante con la delección de 8 nucleótidos 1770-1778 en el genotipo C, encontrada en individuos vacunados de Corea. En ese trabajo se sugiere que esta mutación podría contribuir al escape vacunal a través de la baja replicación, los niveles reducidos de HBsAg y una comprometida capacidad de transactivación de HBxAg por la posición de la delección (Kim et al. 2015). Esta delección no se encuentra en la misma posición que la de nuestro trabajo pero afecta al gen X de manera similar y afecta los mismos elementos regulatorios de la replicación viral (BCP y Enhancer II), por lo que nuestra variante podría llegar a tener la misma habilidad de evasión del sistema inmunológico.

Por lo tanto, dado que esta variante posee una delección que afecta sitios regulatorios de la replicación viral y que produce bajos niveles de las proteínas inmunogénicas (HBsAg, HBcAg), podría evadir en forma eficaz el sistema inmune y por lo tanto presentar una ventaja a nivel de individuo.

Discusión

B) OCUPACIÓN DEL NICHOS ECOLÓGICO

Como se mencionó previamente, el HBV presenta alta heterogeneidad y, como consecuencia, se ha clasificado en diez genotipos y múltiples subgenotipos. En Argentina, recientemente se ha demostrado una alta prevalencia de sgtF1b en infecciones agudas y crónicas HBeAg positivas, seguido por sgtA2, sgtF4 y gtD (Gonzalez Lopez Ledesma et al. 2015; Rodrigo et al. 2016). En este trabajo se hizo la comparación del *fitness* replicativo entre estos (sub)genotipos con el fin de evaluar si estas diferencias observadas en la población se deben a diferencias a nivel replicativo.

Los resultados mostraron un *fitness* replicativo similar entre todas las combinaciones de (sub)genotipos, con la excepción del par sgtF1b-*sgtF4*, que mostró un aumento de la proporción de sgtF1b en la progenie a expensas de sgtF4. Además, cuando se simulaban ciclos seriados de infección, se observó que la relación entre sgtF1b y sgtF4 se movió en la dirección del predominio del sgtF1b. Esto mostró una clara capacidad del sgtF1b para desplazar al sgtF4 durante el ensayo competitivo de producción viral. Este resultado está de acuerdo con el hecho de que el sgtF1b esté ocupando el nicho ecológico de nuevas infecciones en Buenos Aires, Argentina (Gonzalez Lopez Ledesma et al. 2015; Rodrigo et al. 2016). En el caso de las diferencias entre los otros (sub)genotipos no se pudieron asociar a diferencias a nivel replicativo.

La distribución de genotipos del HBV en pacientes con infección aguda e infección crónica HBeAg(+) refleja los genotipos predominantes en un área geográfica determinada y depende de muchos factores, como por ejemplo, el modo de transmisión, el curso de la infección, el tiempo y la tasa de seroconversión, la capacidad replicativa del virus, etc (Lin y Kao 2017). Los genotipos A y D tienen distribuciones geográficas amplias y superpuestas. En el caso de las infecciones agudas, el genotipo A fue reportado como predominante en Japón, mientras que el genotipo D fue el más prevalente en India (Lin y Kao 2017). Por su parte, si bien los sgtF1b y sgtF4 son autóctonos de Sudamérica, el sgtF1b es el predominante en las nuevas infecciones de nuestro país. Sin embargo, existen pocos estudios que comparen estos subgenotipos con los genotipos A y D, sobre todo a nivel replicativo.

Discusión

Nuestros resultados sugieren que más allá de que los genotipos A y D sean más exitosos en otras partes del mundo para ocasionar infecciones agudas, al circular en la misma población con el sgtF1b, éste tendría un mayor *fitness* epidemiológico, que a su vez podría estar asociado a la mayor tasa de seroconversión (Gonzalez Lopez Ledesma et al. 2015). El periodo más prolongado del estadio HBeAg+, con elevada carga viral, facilitaría de manera significativa su transmisión y por lo tanto la ocupación del nicho epidemiológico.

ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS ASOCIADOS A LA DIFERENCIA DEL *FITNESS*

Dado que en los experimentos de *fitness* se obtuvieron diferencias entre las variantes o entre los subgenotipos, se profundizó el estudio sobre los posibles mecanismos moleculares asociados. Para ello, se decidió evaluar la síntesis de los intermediarios replicativos, los niveles de ADN extracelular y el nivel de la expresión de las proteínas HBeAg y HBsAg.

A) PROCESO DE SEROCONVERSIÓN

En la evaluación de *fitness* replicativo, el sgtD1del mostró un *fitness* significativamente menor comparado con sgtD1cs y sgtD1mut. Nuestros resultados mostraron que la síntesis de los intermediarios replicativos intracelulares y los niveles de ADN extracelular de sgtD1del fueron significativamente menores que los de sgtD1cs y sgtD1mut, lo que está de acuerdo con el menor *fitness* observado anteriormente.

Al comparar los niveles de ADN en los experimentos sgtD1cs vs sgtD1del y sgtD1mut vs sgtD1del se evidenció que la mezcla no se comportó de la misma manera en estos dos experimentos. En el caso del sgtD1del vs sgtD1cs, la mezcla se comportó en forma similar a cuando se transfecta la sgtD1cs sola, mientras que la mezcla sgtD1del vs sgtD1mut se comportó como la sgtD1del sola. Esta diferencia fue observable tanto en los niveles de ADN extracelular como de los intermediarios replicativos intracelulares. Esto muestra que en una cotransfección la variante sgtD1del no afecta la capacidad replicativa de la sgtD1cs, sin embargo, cuando esta cotransfectada con sgtD1mut inhibe la replicación del sgtD1mut.

Discusión

Este comportamiento pone en evidencia que las variantes virales no tienen el mismo comportamiento cuando se transfectan por separado que en la cotransfección.

Los resultados donde se evaluaron los niveles de antígenos demuestran que la sgtD1del expresó bajos niveles de HBsAg y no expresó HBeAg. En un estudio previo se reportó similar comportamiento de dos variantes con deleciones en 1763-1770 y en 1753-1772. Las dos mostraron bajos niveles de expresión de las proteínas HBsAg, HBcAg y HBeAg (Moriyama 1997). Considerando que esta deleción afecta al BCP, al Enhancer II y al HBxAg podríamos proponer que la reducción del HBeAg se debe tanto a la actividad reducida del promotor pC como al defecto en HBx.

La sgtD1mut tiene un codón de stop de la traducción, lo que detiene la expresión del HBeAg, que es lo que observamos en los experimentos.

Existen muchas interacciones entre variantes virales en condiciones de cotransfección que no se podrían detectar si sólo se estudian estas variantes transfectadas.

En este sentido, existen reportes de mutantes con baja replicación o expresión de proteínas y que, al cotransfectarlas con la cepa salvaje recuperan la replicación o expresión mediante un mecanismo propuesto de trans-complementación. Por ejemplo, se ha reportado que la variante delecionada expresa bajos niveles de proteínas, pero cotransfectada con baja proporción de la variante con HBx intacto llega a recuperar la expresión (Moriyama 1997). Se ha demostrado que la proteína HBx es un potente transactivador de genes tanto celulares como virales, en particular, los enhancers y promotor del Core por lo cual indirectamente influye la replicación y la producción de proteínas virales. También se ha demostrado que tiene un rol protector para el cccADN degradando un factor celular con actividad antiviral (Liang 2016). Teniendo todo esto en cuenta podemos proponer que uno de los motivos de porque la interacción entre sgtD1del y sgtD1cs resulta beneficiosa es por la presencia de la proteína HBx intacta en las células cotransfectadas. Sin embargo esto no explica la interacción con la sgtD1mut.

La diferencia principal entre las mencionadas cotransfecciones es la presencia de la proteína HBeAg. Las variantes sgtD1del y sgtD1mut no expresan HBeAg, por lo cual el mismo se encuentra ausente en esta cotransfección. Esta proteína no se requiere para la

Discusión

replicación viral pero su conservación durante la evolución sugiere que es funcionalmente ventajosa para el virus. Aunque no se ha determinado su función biológica exacta, se propone que está implicada en la inducción de tolerancia inmune y que tiene un papel antiapoptótico y cancerígeno. Por más que la mayor proporción de HBeAg se secreta de la célula, unos 20% - 30% quedan en el citoplasma y esta propuesto que podrían tener una interacción con las proteínas celulares, aunque esto todavía no está bien descrito (Liu et al. 2016). Considerando que todos los roles hasta ahora descritos para HBeAg involucran regulación o desregulación de distintos procesos celulares, la ausencia de esta proteína podría ser una de las razones del comportamiento que observamos en la cotransfección sgtD1del vs sgtD1mut.

Estos escenarios así como nuestros resultados demuestran la importancia de las cotransfecciones en los experimentos para la evaluación del *fitness*.

B) OCUPACIÓN DE NICHOS ECOLÓGICOS

Anteriormente mostramos el mismo *fitness* replicativo entre todas las combinaciones de genotipos, excepto F1b-F4. En este caso, sgtF1b claramente sobrecrece al sgtF4. Nuestros resultados muestran que sgtF1b presenta niveles significativamente más altos tanto de ADN extracelular como de los intermediarios replicativos intracelulares. Esto muestra una clara diferencia entre estos dos subgenotipos ya en nivel de replicación del genoma. Esto implica que uno de los motivos de por qué el sgtF1b se encuentra en mayor proporción en la población de los pacientes con infección aguda podría ser la ventaja en nivel replicativo.

A su vez, también, se ha evidenciado que aunque sgtF4 tiene el nivel de replicación más bajo, tiene la expresión de HBeAg significativamente más alta. El ARN pregenómico y el ARNm preCore (precursor de HBeAg), se transcriben desde el mismo ORF (pre-C / C) pero los promotores utilizados en su síntesis son genéticamente distintos y regulados separadamente (Kramvis y Kew 1999). Estos dos promotores y los elementos basales de estos dos promotores se solapan parcialmente, pero son genéticamente separables, cada uno de los cuales consta de su propio iniciador transcripcional y una secuencia similar a una caja TATA situada aproximadamente 25 a 30 pb aguas arriba de sus sitios de

Discusión

iniciación. Se informó que algunos activadores transcripcionales activan específicamente la transcripción del promotor pregenómico mientras que otros reprimen específicamente la transcripción del promotor pre-C (Yu y Mertz 1996). Teniendo esto en cuenta, se propone que los sgt F1b y F4 tienen una manera diferencial de uso de factores de transcripción por más que están expuestos al mismo entorno celular. Esto podría llevar a las diferencias a nivel de individuo y podría influenciar el curso de la infección.

Fischer et al. demostraron que el potenciador II del genotipo A del HBV está reprimido por el COUP-TF1, mientras que el potenciador II del genotipo D del HBV está activado mediante COUP-TF1. Ellos proponen que la regulación de la transcripción del genoma del HBV difiera entre los genomas derivados de diferentes genotipos (Fischer et al. 2006). Estas diferencias en el control transcripcional entre los genotipos del HBV pueden ser la base molecular de las diferencias en el curso clínico entre los genotipos del HBV.

Teniendo esto en cuenta, este resultado podría sugerir que una de las diferencias intrínsecas entre sgtF1b y sgtF4 es la regulación de la síntesis de estos dos ARNs. Mientras que sgtF4 parece favorecer la síntesis de HBeAg, sgtF1b favorecería la síntesis del pregenoma. Esta preferencia por la síntesis del genoma podría ser una más de las explicaciones de por qué sgtF1b está ocupando el nicho ecológico de nuevas infecciones en Argentina.

Conclusiones

Conclusiones

Se presenta un nuevo método destinado a evaluar el *fitness* replicativo del HBV. La evaluación del *fitness* replicativo contribuirá a la comprensión de los mecanismos de selección que rigen la infección crónica por el HBV. Este método facilitará el análisis de las interacciones entre diferentes variantes virales en un proceso de cotransfección.

Se demuestra que el *fitness* replicativo está directamente relacionado con la capacidad replicativa de cada variante analizada.

La cotransfección con sgtD1del y sgtD1mut constituye la primera evidencia del impacto en la replicación del HBV cuando dos variantes virales se replican simultáneamente en el mismo sistema celular.

Este trabajo contribuye a la comprensión de por qué sgtF1b está ocupando el nicho ecológico de nuevas infecciones por HBV en Argentina.

Bibliografía

Bibliografía

- (WHO), W.H.O., 2017. Hepatitis B. Fact Sheet No.204. ,
p.<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en>.
- Andino, R. & Domingo, E., 2015. Viral quasispecies. *Virology*, 479-480, pp.46–51.
Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.022>.
- Beck, J. & Nassal, M., 2007. Hepatitis B virus replication. *World journal of gastroenterology : WJG*, 13(1), pp.48–64. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3393573&tool=pmcentrez&rendertype=abstract><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22514339><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17206754>.
- Chen, B.-F., 2016. Different pre-S deletion patterns and their association with hepatitis B virus genotypes. *World Journal of Gastroenterology*, 22(35), pp.8041–8049.
- Ching, L.K. et al., 2016. Incidence of hepatocellular carcinoma according to hepatitis B virus genotype in Alaska Native people. *Liver International*, 36(10), pp.1507–1515.
- Domingo, E. et al., 2000. Cuasiespecies y evolución molecular de virus cuasiespecies e impacto de esta estructura poblacional de los virus RNA. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 19(1), pp.55–63. Available at: <http://www.oie.int/doc/ged/D9287.PDF>.
- Domingo, E. & Gomez, J., 2007. Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Research*, 127(2), pp.131–150.
- Fischer, S.F. et al., 2006. Genotype-dependent activation or repression of HBV enhancer II by transcription factor COUP-TF1. *World Journal of Gastroenterology*, 12(37), pp.6054–6058.
- Fung, S.K. & Lok, A.S.F., 2004. Hepatitis B virus genotypes: Do they play a role in the outcome of HBV infection? *Hepatology*, 40(4), pp.790–792. Available at:
<http://doi.wiley.com/10.1002/hep.20455>.
- Ganem, D. & Prince, A., 2004. Natural History and Clinical Consequences of Hepatitis B Virus Infection. *N Engl J Med*, pp.1118–29. Available at:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15968338.
- Gao, S., Duan, Z.-P. & Coffin, C.S., 2015. Clinical relevance of hepatitis B virus variants. *World journal of hepatology*, 7(8), pp.1086–96. Available at:
<http://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v7/i8/1086.htm><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26052397><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4450185>.

Bibliografía

- Geng, Y. et al., 2016. Mutation Changes in the preC/Core Promoter in HBeAg-Positive Patients With Chronic Hepatitis B During Interferon Therapy. *Medicine*, 95(5), p.e2657. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005792-201602020-00044>.
- Gonzalez Lopez Ledesma, M.M. et al., 2015. Hepatitis B virus genotype distribution and genotype-specific BCP/precore substitutions in acute and chronic infections in Argentina. *PLoS ONE*, 10(3), pp.1–16.
- Grimm, D., Thimme, R. & Blum, H.E., 2011. HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatology International*, 5(2), pp.644–653.
- Hao, R. et al., 2015. Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by hepatocyte nuclear factor 6. *Journal of virology*, 89(8), pp.4345–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25653429>.
- Heermann, K.H. et al., 1984. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *Journal of virology*, 52(2), pp.396–402.
- Van Hemert, F.J. et al., 2011. Protein X of hepatitis B virus: Origin and structure similarity with the central domain of DNA glycosylase. *PLoS ONE*, 6(8).
- Jammeh, S. et al., 2008. Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication. *Journal of General Virology*, 89(4), pp.901–909.
- Kao, J.-H., 2011. Molecular epidemiology of hepatitis B virus. *The Korean journal of internal medicine*, 26(3), pp.255–61. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3192197&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kim, H. et al., 2015. Discovery of a novel mutation (X8Del) resulting in an 8-bp deletion in the hepatitis B virus X gene associated with occult infection in Korean vaccinated individuals. *PLoS ONE*, 10(10), pp.1–13.
- Kramvis, a & Kew, M.C., 1999. The core promoter of hepatitis B virus. *J Viral Hepat*, 6(6), pp.415–427. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10607259.
- Kramvis, A. et al., 2010. Relationship of Serological Subtype, Basic Core Promoter and Precore Mutations to Genotypes/Subgenotypes of Hepatitis B Virus. *Journal of Medical Virology*, 80, pp.27–46.

Bibliografía

- Laras, A., Koskinas, J. & Hadziyannis, S.J., 2002. In vivo suppression of precore mRNA synthesis is associated with mutations in the hepatitis B virus core promoter. *Virology*, 295(1), pp.86–96.
- Liang, T.J., 2016. The X-Files of hepatitis B. *Nature*, 531(7594), pp.95–121.
- Liao, W. & Ou, J.H., 1995. Phosphorylation and nuclear localization of the hepatitis B virus core protein: significance of serine in the three repeated SPRRR motifs. *Journal of virology*, 69(2), pp.1025–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7815479> \n<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC188672>.
- Lin, C.L. & Kao, J.H., 2017. Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 31(3), pp.249–255. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2017.04.010>.
- Liu, D. et al., 2016. Hepatitis B e antigen and its precursors promote the progress of hepatocellular carcinoma by interacting with NUMB and decreasing p53 activity. *Hepatology*, 64(2), pp.390–404.
- Livingston, S.E. et al., 2007. Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F. *The Journal of infectious diseases*, 195, pp.5–11.
- Malmström, S. et al., 2012. Hepatitis B viral DNA decline at loss of HBeAg is mainly explained by reduced cccDNA load - down-regulated transcription of PgRNA has limited impact. *PLoS ONE*, 7(7).
- Milich, D. & Liang, T.J., 2003. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 38(5), pp.1075–1086. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1053/jhep.2003.50453>.
- Moriyama, K., 1997. Reduced antigen production by hepatitis B virus harbouring nucleotide deletions in the overlapping X gene and precore-core promoter. *Journal of General Virology*, 78(6), pp.1479–1486.
- Park, Y.M., 2015. Clinical utility of complex mutations in the core promoter and proximal precore regions of the hepatitis B virus genome. *World Journal of Hepatology*, 7(1), pp.113–120.
- Qin, Y. et al., 2011. Hepatitis B virus genotype C isolates with wild-type core promoter sequence replicate less efficiently than genotype B isolates but possess higher virion secretion capacity. *Journal of virology*, 85(19), pp.10167–10177.

Bibliografía

- Rodrigo, M.B. et al., 2016. Analysis of the Molecular Evolution of Hepatitis B Virus Genotypes in Symptomatic Acute Infections in Argentina. *Plos One*, 11(7), p.e0159509. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0159509>.
- Sallam, T. a. & Tong, C.Y.W., 2002. Two distinct types of hepatitis B virus core promoter variants in Yemeni blood donors. *Journal of Medical Virology*, 68(3), pp.328–334.
- Schaefer, S., 2007. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World journal of gastroenterology : WJG*, 13(1), pp.14–21.
- Sede, M. et al., 2014. Hepatitis B virus depicts a high degree of conservation during the immune-tolerant phase in familiarly transmitted chronic hepatitis B infection: Deep-sequencing and phylogenetic analysis. *Journal of Viral Hepatitis*, 21(9), pp.650–661.
- Seeger, C. & Mason, W.S., 2000. Hepatitis B Virus Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), pp.51–68.
- Shi, W. et al., 2013. Hepatitis B virus subgenotyping: History, effects of recombination, misclassifications, and corrections. *Infection, Genetics and Evolution*, 16, pp.355–361. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.021>.
- Sozzi, V. et al., 2016. In vitro studies show that sequence variability contributes to marked variation in Hepatitis B virus replication, protein expression and function observed across genotypes. *Journal of Virology*, (August), pp.JVI.01293–16. Available at: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.01293-16>.
- Tatematsu, K. et al., 2009. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *Journal of virology*, 83(20), pp.10538–10547.
- Thomas F Baumert, Robert Thimme, F.V.W., 2007. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World Journal of ...*, 13(1), pp.82–90. Available at: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/ejournals/1.pdf#page=91>.
- Tong, S. & Revill, P., 2016. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. *Journal of hepatology*, 64(1S), pp.S4–S16. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827816000635>.
- Wang, Z. et al., 2013. Replication-Competent Infectious Hepatitis B Virus Vectors Carrying Substantially Sized Transgenes by Redesigned Viral Polymerase Translation. *PLoS ONE*, 8(4).
- Yu, X. & Mertz, J.E., 1996. Promoters for synthesis of the pre-C and pregenomic mRNAs of human hepatitis B virus are genetically distinct and differentially regulated. *Journal of virology*, 70(12), pp.8719–8726.

Apéndices

Apéndices

1. TABLAS DE RESULTADOS

a) Experimentos de *fitness*

sgtD1 cs	sgtD1mut
6	11
9	9
8	6
10	10
11	8
11	6

	sgtD1 cs	sgtD1mut
<i>Suma</i>	55	50
<i>Promedio + DS</i>	$9,1 \pm 1,9$	$8,3 \pm 2,0$

sgtD1 cs	sgtD1del
17	3
14	4
17	3
12	7
16	4
14	5

	sgtD1 cs	sgtD1del
<i>Suma</i>	90	26
<i>Promedio + DS</i>	$15,0 \pm 2,0$	$4,3 \pm 1,5$

sgtD1mut	sgtD1del
10	9
14	5
14	5
16	4
17	3
16	4

	sgtD1mut	sgtD1del
<i>Suma</i>	87	30
<i>Promedio + DS</i>	$14,5 \pm 2,5$	$5,0 \pm 2,1$

Apéndices

sgtD1	sgtF1b
6	13
11	9
8	8
12	8
8	12
9	11

	sgtD1	sgtF1b
<i>Suma</i>	54	61
<i>Promedio + DS</i>	$9,0 \pm 2,2$	$10,2 \pm 2,1$

sgtD1	sgtF4
9	8
10	10
9	10
9	11
8	12
11	9

	sgtD1	sgtF4
<i>Suma</i>	56	60
<i>Promedio + DS</i>	$9,3 \pm 1,0$	$10,0 \pm 1,4$

sgtF1b	sgtA2
10	8
9	6
9	9
7	10
9	9
11	4

	sgtF1b	sgtA2
<i>Suma</i>	55	46
<i>Promedio + DS</i>	$9,1 \pm 1,3$	$7,6 \pm 2,2$

sgtF4	sgtA2
9	11
11	3
10	6
10	9
6	5
6	9

	sgtF4	sgtA2
<i>Suma</i>	52	43
<i>Promedio + DS</i>	$8,6 \pm 2,1$	$7,1 \pm 3,0$

Apéndices

sgtD1	sgtA2
11	9
9	8
9	10
8	8
9	11
8	7

	sgtD1	sgtA2
<i>Suma</i>	54	53
<i>Promedio + DS</i>	$9,0 \pm 1,1$	$8,8 \pm 1,5$

sgtF1b	sgtF4
11	8
9	6
12	5
11	9
9	11
11	8
13	5
16	2
11	5
9	9
11	8
5	10

	sgtF1b	sgtF4
<i>Suma</i>	128	86
<i>Promedio + DS</i>	$10,7 \pm 2,6$	$7,1 \pm 2,6$

Ciclos

sgtF1b	sgtF4
13	5
17	2
9	8
14	3
14	6
14	6

	sgtF1b	sgtF4
<i>Suma</i>	81	30
<i>Promedio + DS</i>	$13,5 \pm 2,6$	$5,0 \pm 2,2$

sgtF1b	sgtF4
13	6
18	2
16	4
11	6
18	2
17	2

	sgtF1b	sgtF4
<i>Suma</i>	93	22
<i>Promedio + DS</i>	$15,5 \pm 2,9$	$3,7 \pm 2,0$

sgtF1b	sgtF4
18	2
19	1
20	0
18	1
17	3
19	1

	sgtF1b	sgtF4
<i>Suma</i>	111	8
<i>Promedio + DS</i>	$18,5 \pm 1,0$	$1,3 \pm 1,0$

Apéndices

b) Experimentos de análisis de los mecanismos asociados a la diferencias del *fitness*

Todos los resultados están relativizados con luciferasa y expresados por unidad de luz – RLU.

Experimento de seroconversión:

Southern blot

sgtD1 cs	sgtD1del	Mix
0,63	0,190	0,77
0,92	0,018	0,98
0,40	0,110	1,30

sgtD1 cs	sgtD1mut	Mix
0,57	0,90	0,90
0,21	0,21	0,36
0,87	1,11	1,17

sgtD1del	sgtD1mut	Mix
0,243	0,483	0,164
0,191	1,027	0,266
0,309	1,317	0,238

PCR en tiempo real

sgtD1 cs	sgtD1mut	sgtD1del	Mix (cs+mut)	Mix (cs+del)	Mix (mut+del)
41,47	46,85	4,57	12,68	79,50	1,46
14,38	17,75	11,78	16,53	22,55	9,88
29,75	45,97	9,88	29,50	28,17	7,57

HBeAg

sgtD1 cs	sgtD1mut	sgtD1del	Mix (cs+mut)	Mix (cs+del)	Mix (mut+del)
0,020000	No Reactivo	No Reactivo	0,0091	0,0071	No Reactivo
0,009400	No Reactivo	No Reactivo	0,0011	0,0068	No Reactivo
0,008600	No Reactivo	No Reactivo	0,0034	0,0084	No Reactivo

HBsAg

sgtD1 cs	sgtD1mut	sgtD1del	Mix (cs+mut)	Mix (cs+del)	Mix (mut+del)
0,00079	0,00052	0,00015	0,00064	0,00036	0,00022
0,00079	0,00022	0,00014	0,00012	0,00044	0,00015
0,00066	0,00024	0,00013	0,00040	0,00068	0,00011

Apéndices

Experimento de ocupación de nicho ecológico:

<i>Southern blot</i>	<table border="1"><thead><tr><th>sgtF1b</th><th>sgtF4</th><th>Mix</th></tr></thead><tbody><tr><td>0,23</td><td>0,03</td><td>0,21</td></tr><tr><td>0,21</td><td>0,09</td><td>0,16</td></tr><tr><td>0,31</td><td>0,16</td><td>0,17</td></tr></tbody></table>	sgtF1b	sgtF4	Mix	0,23	0,03	0,21	0,21	0,09	0,16	0,31	0,16	0,17
	sgtF1b	sgtF4	Mix										
	0,23	0,03	0,21										
	0,21	0,09	0,16										
0,31	0,16	0,17											

<i>PCR en tiempo real</i>	<table border="1"><thead><tr><th>sgtF1b</th><th>sgtF4</th><th>Mix</th></tr></thead><tbody><tr><td>11,86</td><td>4,85</td><td>17,67</td></tr><tr><td>14,20</td><td>10,48</td><td>12,54</td></tr><tr><td>15,18</td><td>8,14</td><td>14,39</td></tr></tbody></table>	sgtF1b	sgtF4	Mix	11,86	4,85	17,67	14,20	10,48	12,54	15,18	8,14	14,39
	sgtF1b	sgtF4	Mix										
	11,86	4,85	17,67										
	14,20	10,48	12,54										
15,18	8,14	14,39											

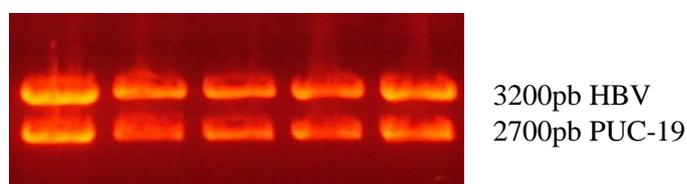
<i>HBeAg</i>	<table border="1"><thead><tr><th>sgtF1b</th><th>sgtF4</th><th>Mix</th></tr></thead><tbody><tr><td>0,001410</td><td>0,00447</td><td>0,00260</td></tr><tr><td>0,002340</td><td>0,00511</td><td>0,00253</td></tr><tr><td>0,001850</td><td>0,00404</td><td>0,00314</td></tr></tbody></table>	sgtF1b	sgtF4	Mix	0,001410	0,00447	0,00260	0,002340	0,00511	0,00253	0,001850	0,00404	0,00314
	sgtF1b	sgtF4	Mix										
	0,001410	0,00447	0,00260										
	0,002340	0,00511	0,00253										
0,001850	0,00404	0,00314											

<i>HBsAg</i>	<table border="1"><thead><tr><th>sgtF1b</th><th>sgtF4</th><th>Mix</th></tr></thead><tbody><tr><td>0,00846</td><td>0,00812</td><td>0,01100</td></tr><tr><td>0,01150</td><td>0,00971</td><td>0,00896</td></tr><tr><td>0,01250</td><td>0,00876</td><td>0,01090</td></tr></tbody></table>	sgtF1b	sgtF4	Mix	0,00846	0,00812	0,01100	0,01150	0,00971	0,00896	0,01250	0,00876	0,01090
	sgtF1b	sgtF4	Mix										
	0,00846	0,00812	0,01100										
	0,01150	0,00971	0,00896										
0,01250	0,00876	0,01090											

Apéndices

2. PUESTA A PUNTO Y VALIDACIONES

a) Una alícuota de cada clon utilizado en los experimentos de transfección fue digerida con la enzima de restricción BspQI y los fragmentos obtenidos fueron resueltos en un gel de agarosa para verificar la presencia del genoma completo. Posteriormente los clones se crecieron en mezclas, se cortaron con la enzima BSPQI, los fragmentos se separaron en un gel de agarosa y se purificó la banda de aproximadamente 3200pb correspondiente a genoma de HBV.



b) Se corroboró la utilidad de las PCRs y las enzimas de restricción, utilizadas para discriminar las variantes cotransfectadas, utilizando variantes con características conocidas.

Variantes confrontadas	Tamaño de fragmento	Enzima de restricción	Resultado esperado (tamaños de las bandas)
sgtD1cs + sgtD1mut	320 pb	NlaIV	sgtD1cs: 290 pb + 30 pb sgtD1mut: 320 pb
sgtD1cs + sgtD1del	121pb o 113 pb	-	sgtD1cs: 121pb sgtD1del: 113 pb
sgtD1mut + sgtD1del	121pb o 113 pb	-	sgtD1mut: 121pb sgtD1del: 113 pb

→

→

→

Apéndices

Genotipos confrontados	Tamaño de fragmento	Enzima de restricción	Resultado esperado (tamaños de bandas)
sgtD1 + sgtF4	334 pb	XhoI	sgtD1: 264 pb + 70 pb sgtF4: 334 pb
sgtD1 + sgtF1b	334 pb	XhoI	sgtD1: 264 pb + 70 pb sgtF1b: 334 pb
sgtF1b + sgtF4	631 pb	HindIII	F1b: 463 pb + 168 pb F4: 631 pb
sgtA2 + sgtF1b	631 pb	HindIII	F1b: 463pb + 168pb A2: 631 pb
sgtA2 + sgtF4	762 pb	SmaI	F4: 497 pb + 265 pb A2: 762 pb
sgtA2 + sgtD1	1130 pb	EcoRI	A2: 721 pb + 409 pb D1: 1130 pb

c) Para determinar la duración de experimento de transfección, en primer lugar se realizó la cinética de producción, en paralelo al experimento de eficiencia de los lavados. Se transfectaron cuatro pocillos con la cepa replicativa y cuatro pocillos con el Mock. Se cosechó el sobrenadante de cada una de las variantes transfectadas a las 24h, 48h, 72h y 96hs. Posteriormente, se realizó la extracción y amplificación con los cebadores s: ATGGAGACCACCGTGAACGC y as: AGGCACAGCTTGGTGGCTTG

Apéndices

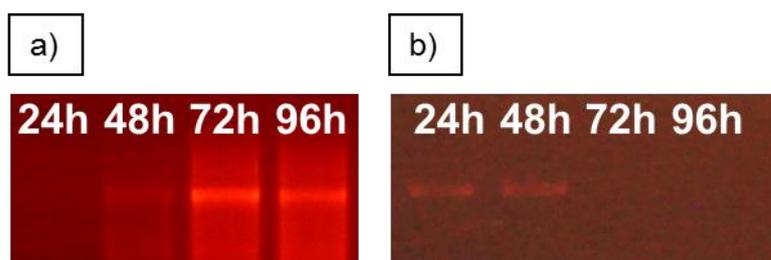


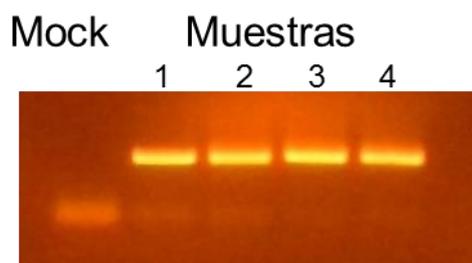
Foto: a) Producción – cepa replicativa (con tratamiento con DNAsa, 40 ciclos)

b) Eficiencia de lavados - Mock (sin DNAsa; 40 ciclos, primera ronda).

En el caso de experimento de producción (foto a) se evidenció que a las 72h y 96h se produce la mayor cantidad de ADN. En el caso de experimento de eficiencia de lavado (foto b) se observó que el lavado tiene baja eficiencia a las 24h y 48h, mientras que a las 72h y 96h no se detecta ADN viral. Considerando que todos los protocolos de PCR utilizados para la evaluación de la progenie tenían sólo una ronda de amplificación y con menos de 40 ciclos se tomaron las cosechas a 72h y 96h como posibles candidatos.

A las 72h podría existir una cantidad de ADN proveniente del *input* que se encuentra por debajo de límite de detección de la PCR, pero podría llegar a detectarse en el clonado, y así sesgar el resultado del análisis. Teniendo eso en cuenta, se decidió no trabajar con ese tiempo y se eligió hacer la cosecha a 96h postransfección ya que así se podría realizar un análisis sólo de la producción viral.

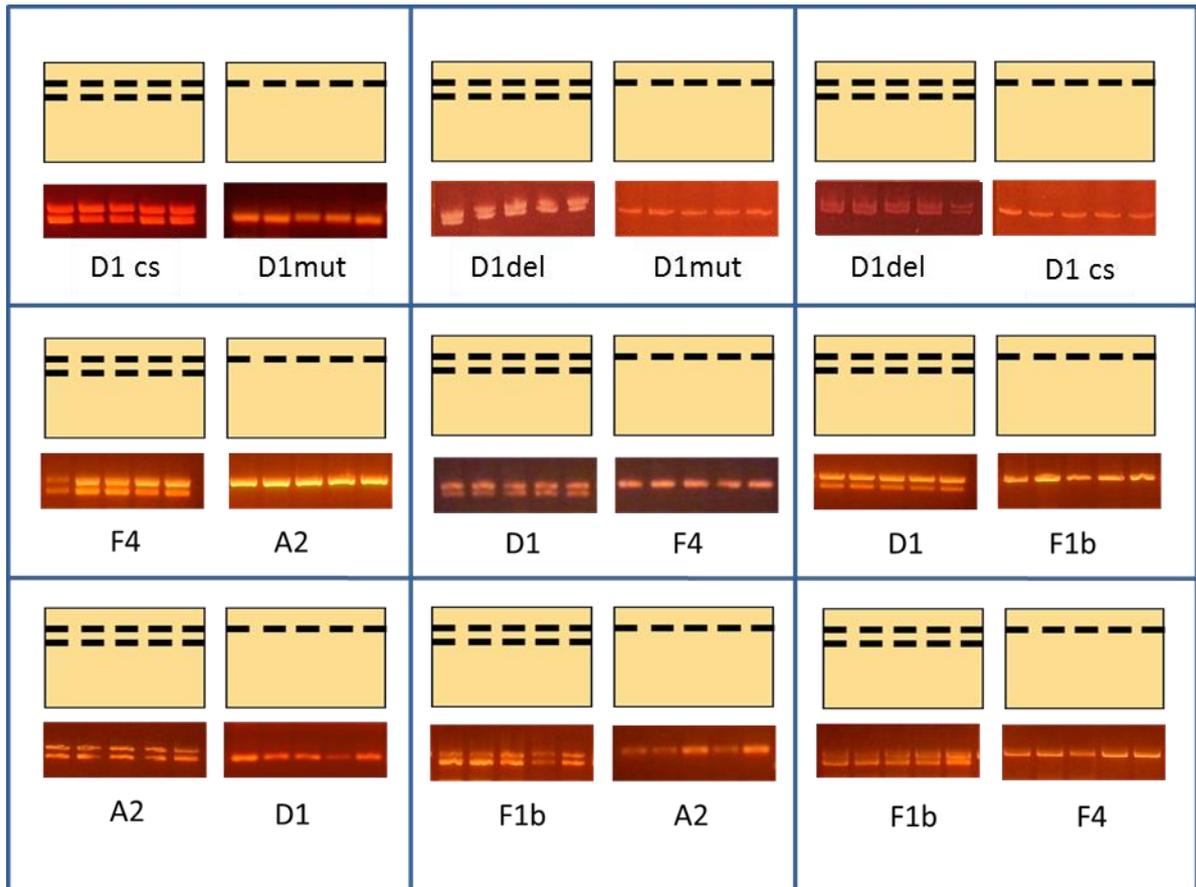
d) Un pocillo por experimento fue transfectado con mock (la cepa de HBV que no replica) como control de input remanente y se realizó una PCR de 30 ciclos. En todos los experimentos se observó que los lavados realizados resultaron suficientes para eliminar el ADN de input, ya que no se observó ningún producto de amplificación.



Ejemplo de lo que se consideraba resultado aceptable

Apéndices

e) En cada experimento se realizó también la transfección de un pocillo de cada variante viral confrontada por separado a fin de emplearlo como control de ADN utilizado en la transfección. Se cosechó el sobrenadante de esos pocillos como se describió previamente y se clonó. Se eligieron múltiples clones al azar, se amplificaron y se digirieron para verificar que cada variante viral replicó, se clonó, amplificó y digirió como se esperaba.



Ejemplo de lo que se consideraba un resultado aceptable

f) Los cebadores utilizados en los experimentos de fitness fueron previamente evaluados mediante el método de dilución límite con el fin de asegurar que los cebadores amplificaran a las dos variantes confrontadas con la misma afinidad, bajo las mismas condiciones utilizadas en cada amplificación (numero de ciclos y temperatura de hibridación). Bajo las condiciones experimentales utilizadas, se obtuvieron los fragmentos esperados a partir de las dos variantes confrontadas en la misma dilución y aproximadamente con la misma concentración de producto.

Apéndices

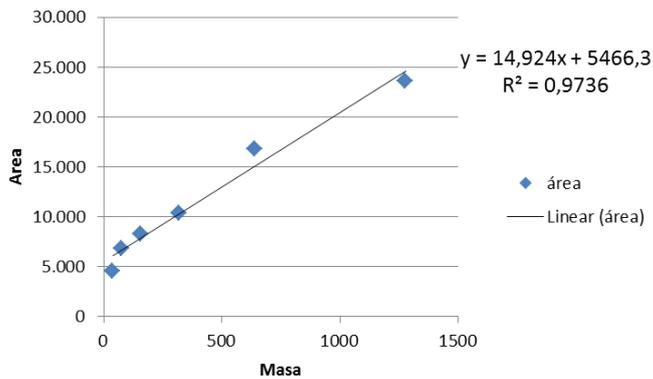
D1cs Vs D1mut	10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} (pg) 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} (pg)
D1cs	
D1mut	

sgtF1b vs sgtF4	10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} (pg) 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} (pg)
F1b	
F4	
sgtF1b vs sgtD1	10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} (pg) 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} (pg)
F1b	
D1	
sgtF4 vs sgtD1	10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} (pg) 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} (pg)
F4	
D1	
sgtF1b vs sgtA2	10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} (pg) 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} (pg)
F1b	
A2	
sgtA2 vs sgtD1	10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} (pg) 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} (pg)
A2	
D1	
sgtF4 vs sgtA2	10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} (pg) 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} (pg)
F4	
A2	

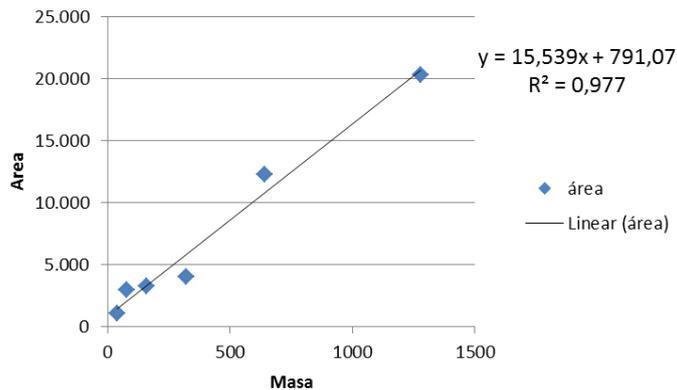
Apéndices

g) En todos los experimentos de *Southern blot* se evaluó la linealidad. Se tomó el valor de $R^2 > 0,95$ como criterio de linealidad.

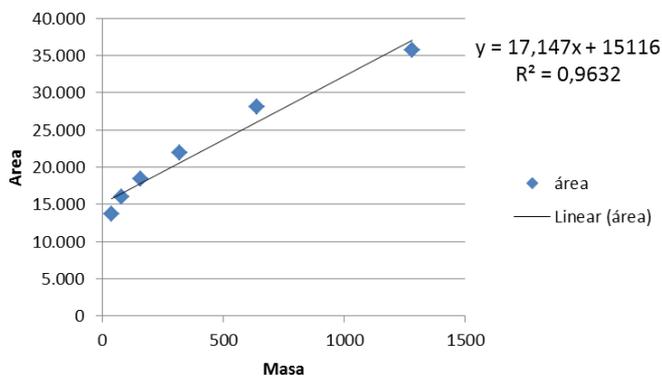
sgtD1cs + sgtD1mut
Southern blot



sgtD1cs + sgtD1del
Southern blot



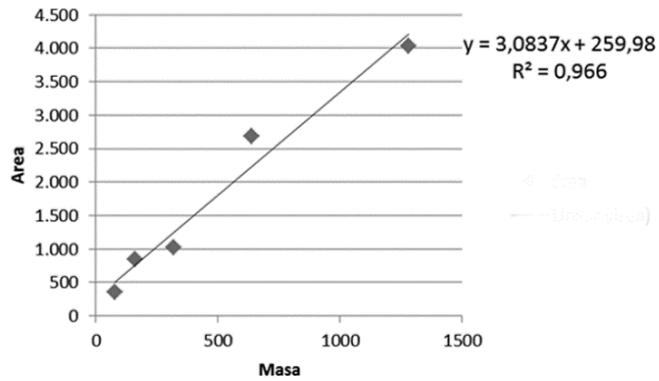
sgtD1del + sgtD1mut
Southern blot



Apéndices

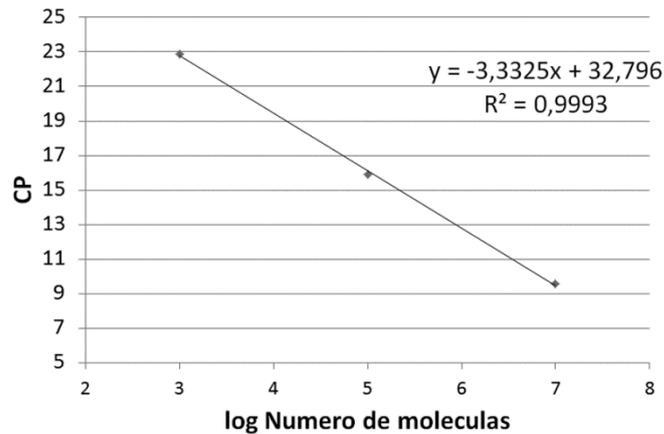
sgtF1b + sgtF4

Southern blot

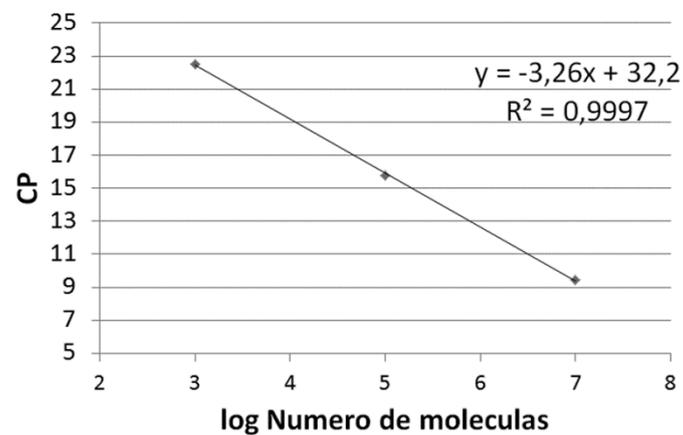


h) En todos los experimentos de PCR en tiempo real se evaluó la linealidad. Se tomó el valor de $R^2 > 0,99$ como criterio de linealidad.

sgtD1cs+sgtD1mut; sgtD1cs+sgtD1del; sgtD1mut+sgtD1del



sgtF1b + sgtF4



Apéndices

i) Control de sonda de *Southern blot*:

Se prepararon las sondas de las PCRs subgenómicas para cada variante viral, se purificó y cuantificó cada una por separado. En cada experimento se utilizó la mezcla de las sondas de las variantes evaluadas ese experimento. Las sondas preparadas de esta manera se utilizaron en gran exceso para asegurar que todas las variantes fueran reveladas con la misma eficiencia.

Se realizó un *Southern blot* con el control células (CC) y tres muestras (M1, M2, M3) y se reveló en condiciones de saturación leve y saturación fuerte para asegurar que la sonda no se une inespecíficamente al ADN proveniente de la célula.

